

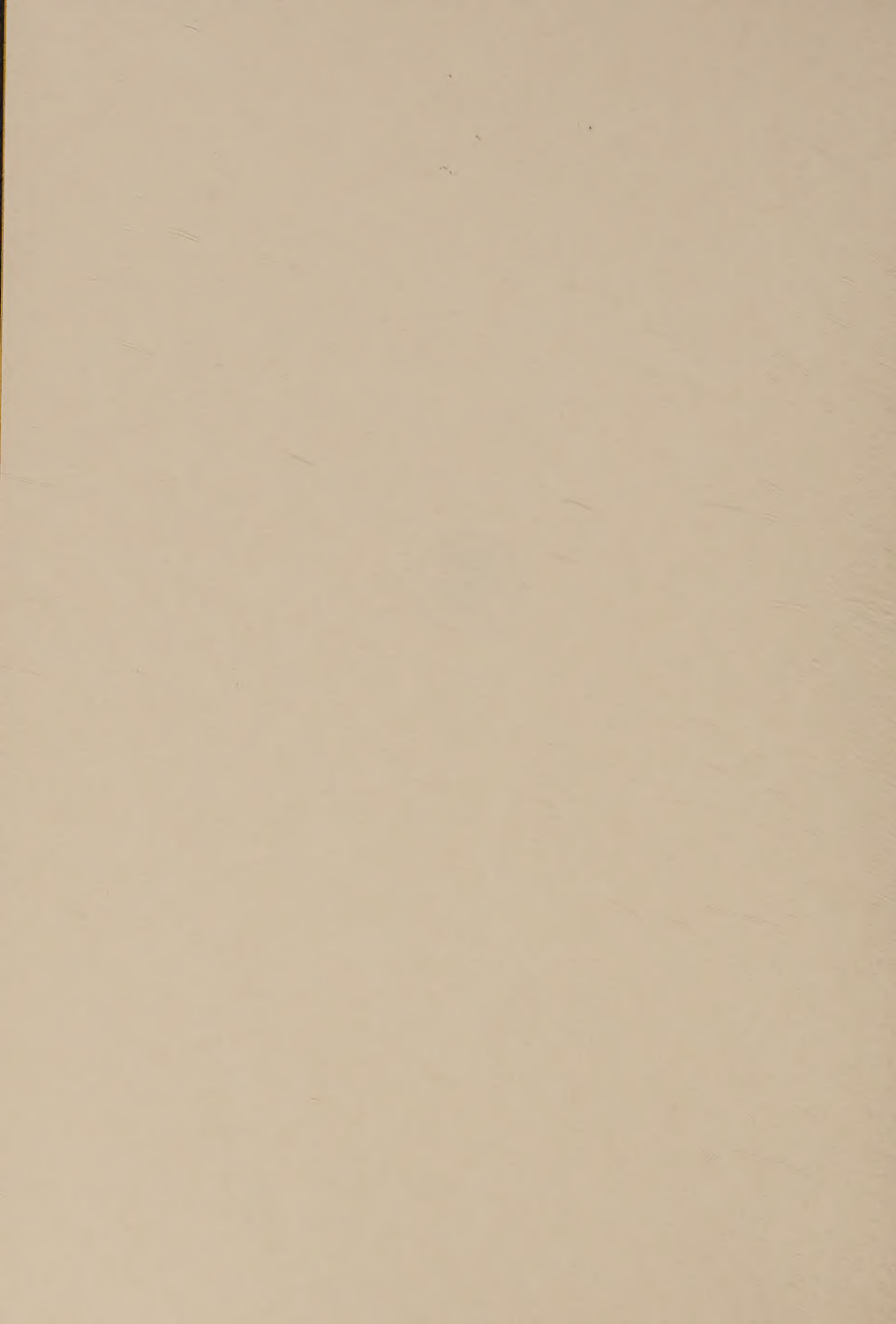
ZUR PRIMÄRSTRUKTUR DES
INTER - α - TRYPSININHIBITOR KOMPLEXES

Thomas Schreitmüller

Disbui. München

1988





ZUR PRIMÄRSTRUKTUR DES

INTER - α - TRYPSININHIBITOR KOMPLEXES

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Thomas Schreitmüller

Juli 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 09. 1988

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. H. Fritz für die Überlassung der Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Dr. W. Gebhard dessen Ratschläge und Diskussionsbereitschaft nicht zuletzt zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Desweiteren bedanke ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Gebhard: Giesela Leysath, Gabriele Zuckriegl, Monika Krautstrunk, Mattias Schube und Ulrich Thiele, die durch ihr stets freundliches und hilfsbereites Verhalten erfolgreiches Arbeiten ermöglichten.

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

...

... ..
... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

...

...

...

...

...

Inhalt

I.	Zusammenfassung.....	1
II.	Einleitung.....	2
III.	Material.....	5
III-1.	Die Lambda gt-11 cDNA Bank.....	5
III-2.	Der Klonierungs- und Sequenzierungsvektor pTZ19(18)R....	6
III-3.	Bakterienstämme.....	7
III-4.	Bakteriennährmedium.....	7
III-5.	Das Anti-HITI-Antiserum.....	7
III-6.	Immunologische Reagenzien.....	7
III-7.	Enzyme.....	8
III-8.	Häufig verwendete Puffer.....	8
IV.	Methoden.....	9
IV-1.	Optimieren der Antikörperkonzentrationen für das Sichten der Lambda-gt11 Expressionsgenbank.....	9
IV-2.	Charakterisierung der Lambda-gt11 Expressionsgenbank....	9
IV-2.1	Herstellung der kompetenten Zellen.....	9
IV-2.2	Ausplattieren der Phagenverdünnungen.....	10
IV-2.3	Bestimmung des Rekombinantenanteils.....	10
IV-3.	Immunologisches Sichten der Lambda-gt11 Expressions- genbank.....	10
IV-4.	Sichten der Lambda-gt11 cDNA-Bank durch Nuklein- säurehybridisierung.....	11
IV-5.	Koloniehybridisierung mit Oligonukleotiden.....	12
IV-6.	Präparieren von Lambda Phagen-DNA.....	12

IV-7.	Transformation kompetenter <u>E. coli</u> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	13
IV-8.	Isolierung von Plasmid-DNA.....	14
IV-9.	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA.....	14
IV-10.	Entfernung von Enzymen aus Reaktionsansätzen mit DNA..	15
IV-11.	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	15
IV-12.	Dephosphorylierung der 5'-Enden von doppelsträngiger-DNA.....	15
IV-13.	Glätten von 3'- und 5'-überstehenden Enden von doppelsträngiger-DNA.....	15
IV-13.1	Eliminieren überstehender Enden mit Mung Bean-Nuklease.....	15
IV-13.2	Auffüllen von 3'-zurückgezogenen Enden mit <u>E. coli</u> DNA-Polymerase [Klenow-Fragment].....	16
IV-14.	Ligieren von DNA.....	16
IV-15.	Gel-Elektrophorese von DNA.....	16
IV-16.	Isolierung von DNA-Restriktionsfragmenten aus Polyacrylamid- oder Agarosegelen.....	17
IV-16.1	Elektroelution.....	17
IV-16.2	Elektrophorese auf DE 81 Papier.....	17
IV-17.	Sequenzieren von doppelsträngiger-Plasmid-DNA.....	17
IV-18.	ExonukleaseIII-Degradation in pTZ19R klonierter cDNA..	19
IV-19.	Aufarbeitung und Reinigung spezifischer Oligonukleotide für die Sequenzanalyse.....	20
IV-20.	Expression in pTZ19R klonierter cDNA-Fragmente in <u>E. coli</u>	21

IV-21.	SDS-Gelelektrophorese von Proteinen.....	21
IV-22.	Proteintransfer aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot).....	21
IV-23.	Immundetektion von Proteinen im Western-Blot.....	21
IV-24.	Analyse der DNA-Sequenzdaten.....	22
V.	Ergebnisse.....	23
V-1.	Sichten der Lambda gt-11 cDNA Expressionsbank mit HITI-Antiserum.....	23
V-1.1	Optimieren der Antikörperkonzentrationen.....	23
V-1.2	Charakterisierung der Lambda-gt11-cDNA Bank.....	24
V-1.3	Detektion der ersten HITI-cDNA-Klone im Phagen Lambda gt-11.....	25
V-1.4	Vorläufige Charakterisierung der ersten HITI-cDNA- Fragmente durch partielle Restiktions- und Sequenz- analyse.....	26
V-2.	Vollständige Charakterisierung der partiellen HITI- cDNA-Klone HITI-1.2, HITI-2.1 und HITI-3.1 durch Restriktions- und Sequenzanalyse der cDNA-Fragmente sowie durch Western-Blots ihrer Expressionsprodukte...	28
V-2.1	Restriktionsanalyse.....	28
V-2.2	Sequenzanalyse.....	30
V-2.3	Western-Blot Analyse.....	35
V-2.4	Vorläufige Analyse der cDNA-Sequenzdaten von HITI-1.2, HITI-2.1 und HITI-3.1.....	36
V-3.	Vervollständigung der Sequenzdaten für die drei HITI- Proteine kodierenden cDNAs HITI-1, HITI-2 und HITI-3...	38

V-4.	Vervollständigung der Sequenzdaten der für das HITI-Protein-1 kodierenden cDNA HITI-1.....	40
V-4.1	Die vollständige cDNA- und davon abgeleitete Proteinsequenz für das HITI-Protein-1.....	41
V-5.	Vervollständigung der Sequenzdaten der für das HITI-Protein-2 kodierenden cDNA HITI-2.....	41
V-5.1	Die vollständige cDNA- und davon abgeleitete Proteinsequenz für das HITI-Protein-2.....	43
V-6.	Vervollständigung der Sequenzdaten der für das HITI-Protein-3 kodierenden cDNA HITI-3.....	46
V-6.1	Die partielle cDNA- und davon abgeleitete Proteinsequenz für das HITI-Protein-3.....	51
VI.	Diskussion.....	55
VI-1.	Inter- α -trypsininhibitor ist ein Komplex dreier Protein-komponenten.....	55
VI-2	Die Präpro-Proteine aller drei Komplexkomponenten werden extensiv proteolytisch prozessiert.....	56
VI-2.1	Die proteolytische Prozessierung des HITI-Präpro-Protein-1.....	56
VI-2.2	Die proteolytische Prozessierung des HITI-Präpro-Protein-2.....	56
VI-2.3	Die proteolytische Prozessierung des HITI-Präpro-Protein-3.....	59
VI-3.	Sequenzvergleich der HITI-Proteine 2 und 3.....	60
VI-4.	Mögliche Physiologische Bedeutung der Komplex-Natur des Inter- α -trypsininhibitors.....	62

VII.	Literatur.....	65
VIII.	Abkürzungsverzeichnis.....	70
IX.	Lebenslauf.....	71



I. Zusammenfassung

Erstmals wird durch das Klonieren und die vollständige Sequenzanalyse dreier unabhängiger cDNA-Spezies (HITI-1, HITI-2 und HITI-3) gezeigt, daß Inter- α -trypsininhibitor (240kDa) ein sehr stabiler Komplex dreier Proteinkomponenten und nicht wie bisher angenommen ein einkettiges Molekül ist. Die mehrfache proteolytische Prozessierung der unabhängig synthetisierten Vorläuferproteine muß als essentielles Charakteristikum der Biosynthese des Inter- α -trypsininhibitor-Komplexes gesehen werden.

Ein zur Verfügung stehender Satz Peptidsequenzen, der aus nativem, gereinigtem Inter- α -trypsininhibitor nach Protease- oder Bromcyanspaltung erhalten worden war, kann vollständig auf diskrete, zusammenhängende Teilbereiche der jeweils offenen Leseraster aller drei cDNA-Spezies verteilt werden. Dadurch wird es möglich, die Existenz intrazellulärer Präpro-Formen der Komplexkomponenten abzuleiten.

Die erste der drei Komponenten des Inter- α -trypsininhibitor-Komplexes ist identisch mit der Vorläuferform des Harntrypsininhibitors. Die inhibitorisch wirksamen Kunitztyp-Domänen werden neben α_1 -Mikroglobulin aus dem Vorläufermolekül nach Abspaltung des Signalpeptids proteolytisch freigesetzt. Nur sie werden Bestandteil des muren Inter- α -trypsininhibitor-Komplexes.

Auch bei der Reifung der Vorläuferformen der beiden anderen Komplexkomponenten, die mit keiner bislang bekannten Proteinsequenz signifikante Übereinstimmungen, jedoch deutliche Sequenzähnlichkeiten zueinander aufweisen, werden N- und C-terminale Peptide freigesetzt. Diese wurden im Gegensatz zu α_1 -Mikroglobulin bisher nicht als freie Serumproteine beschrieben.

Von den drei Komplexkomponenten liefert bisher nur die Inhibitor-Komponente Hinweise auf die physiologische Bedeutung des Inter- α -trypsininhibitor-Komplexes. In vitro-Befunde deuten an, daß sie sowohl als Serinproteinaseinhibitor als auch als Wachstumsfaktor für Endothelzellen fungiert.

II. Einleitung

Unter den im Humanplasma vorkommenden Proteinaseinhibitoren weist Inter- α -trypsininhibitor (HITI) nach α_2 -Makroglobulin und dem α_1 -Proteinaseinhibitor mit 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ die dritthöchste Konzentration dieser Proteingruppe auf

Das Protein wurde erstmals im Jahr 1961 von Steinbuch und Loeb aus Humanplasma isoliert und zunächst als "Glycoprotein π " bezeichnet (Steinbuch et al., 1966). Der Name Inter- α -trypsininhibitor entstand aufgrund der elektrophoretischen Mobilität des Proteins bei der Papier- und Zelluloseacetatfolien-Elektrophorese (zwischen der von α_1 - und α_2 -Globulinen) und seiner Hemmaktivität gegenüber bovinem Trypsin (Heide et al., 1965).

Eine zügige Charakterisierung des säurelabilen Inhibitors erwies sich als schwierig, da viele Reinigungsverfahren Fragmentierungen des Proteins zur Folge hatten (Steinbuch, 1976). So konnten erst 1981 von Salier et al. homogene HITI-Präparationen erhalten werden.

Das Molekulargewicht des als einkettig beschriebenen Proteins wurde zu ca. 180 000 bestimmt. Der Kohlenhydratanteil beträgt 8.4% (Heimburger, 1971). HITI ist möglicherweise ein Metalloprotein, das eine Koordinationsstelle für Zink besitzt (Steinbuch et al 1966). Der Inhibitor hemmt neben Rindertrypsin und -chymotrypsin (Heide et al., 1965; Heimburger et al., 1972) auch humanes Acrosin (Fritz et al., 1972), humane neutrophile Elastase (Jochum und Bittner, 1983) und humanes Cathepsin G (Morii und Travis, 1985). Durch die Behandlung des isolierten Proteins mit den verschiedensten Proteasen lassen sich HITI-Fragmente erzeugen, bei welchen die Hemmaktivität erhalten bleibt (Hochstraßer et al., 1976; Dietl et al., 1979; Péjaudier et al., 1983). Die erste der beiden tandemartig angeordneten Inhibitor-Domänen vom Kunitz-Typ hemmt Elastase (Met im aktiven Zentrum des Inhibitors), wogegen die zweite (Arg im aktiven Zentrum des Inhibitors) Trypsin hemmt. Sie lassen sich mit bovinem Trypsin aus HITI freisetzen und werden als HI-30 bezeichnet (Wachter und Hochstraßer, 1979). Nach der Behandlung von HITI mit Serratia marcescens Metalloprotease wurden

ein 100kD- und ein 80kD-Fragment gefunden. Die N-terminale Aminosäuresequenz des 80kD-Fragments ist identisch mit der von nativem HITI (Morii und Travis, 1985), von HI-30 (Wachter und Hochstraßer, 1979) und mit der des humanen Harntrypsininhibitor (HUTI), einem im menschlichen Harn vorkommenden, glykosylierten Trypsininhibitor (Shulman, 1955), dessen Aminosäuresequenz von Wachter und Hochstraßer (1981) bestimmt worden ist.

Da immunologisch mit HITI verwandte, kleinere Inhibitoren in den verschiedensten Körperflüssigkeiten vorkommen, wurde vermutet, daß diese wie HUTI aus dem "Proinhibitor" HITI proteolytisch freigesetzt werden (Hochstraßer et al., 1976).

Zur physiologischen Funktion von HITI gibt es wenig Hinweise. So steigt zum Beispiel die Konzentration von HI-30 im Serum bei Patienten mit Nephropathien um das dreißigfache an, und bei Urämie ist ebenfalls ein deutlicher HITI-Anstieg zu beobachten (Hochstraßer et al., 1974). Auch bei entzündlichen Prozessen ist eine Erhöhung der HI-30 Konzentration im Serum zu erkennen (Witte et al., 1982). Das Glykoprotein EDC1, das vermutlich identisch mit HUTI ist, wird von Patienten mit metastasierenden Tumoren verstärkt (x100) ausgeschieden (Chawla et al., 1978).

Zweifel an der bis dato beschriebenen Struktur für HITI konnten erstmals 1983 nach Experimenten von Bourguignon et al. formuliert werden. Die Gruppe konnte nach Größenfraktionierung von mRNA, zellfreier Translation und Immunopräzipitation mit anti-HITI Antiserum zwei mRNA-Populationen aus Pavianleber detektieren, die für ein 95kD-Protein und ein 40kD-Protein kodieren. Weitere immunologische Studien ergaben, daß Epitope des größeren Proteins zwar in nativem HITI, nicht aber in HUTI enthalten sind, Epitope des kleineren jedoch in beiden. Nativer HITI sollte dementsprechend als Komplex aus einer "schweren Kette" (95kD) und zwei "leichten Ketten" (40kD) aufgebaut sein.

Dem steht jedoch entgegen, daß HITI selbst unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nur als einzelne Bande erscheint. Darüber hinaus steht die Interpretation des obigen Befundes auch nicht in Einklang mit dem berechneten Molekulargewicht von 15 340 für den Polypeptidanteil des HUTI (Wachter

und Hochstraßer, 1981). Entweder ist das 40kD Protein (unglykosyliert) ein Vorläufer, der aus zwei HUTI-Einheiten besteht, oder HUTI entsteht beim Abbau des posttranslational glykosylierten 40kD-Polypeptids.

Die vollständige Aufklärung der HITI-Primärstruktur sollte zur Lösung der aufgezeigten Widersprüche bezüglich der Struktur sowie zu Hinweisen auf die bislang unbekannte Funktion des Proteins in vivo führen.

III. Material

III-1. Die Lambda-gt11 cDNA Bank

2 · 10⁸ rekombinante Phagen einer Lambda-gt11 cDNA Bank, hergestellt aus mRNA humaner Leber, wurden freundlicherweise von Dr. S.L.C. Woo (Huston, Texas) zur Verfügung gestellt (Kwok et al., 1985). Diese Bank enthält cDNA-Insertionen der mittleren Größe von 1.1kBp und diente für die erfolgreiche Isolierung von full-length-Klonen diverser Plasmaproteine (Kwok et al., 1985; Rauth, 1987). Die rekombinanten Phagen wurden hier erstmals von G. Rauth (Rauth, 1987) amplifiziert und werden im Folgendem als Lambda-gt11 cDNA Bank bezeichnet.

Die wesentlichen Merkmale des Expressionsvektors Lambda-gt11 sind in Abb.1 dargestellt.

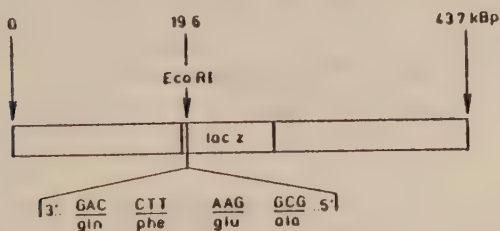


Abb.1: Schematische Darstellung des Expressionsvektors Lambda-gt11. Im 3'-terminalen Bereich des lacZ-Gens befindet sich die singuläre EcoRI-Schnittstelle innerhalb der die cDNA-Insertion erfolgt. Im unteren Teil der Abbildung sind die vier Aminosäuren des C-terminalen Bereichs von β -Galaktosidase gezeigt, an welchen das von der cDNA kodierte Protein mit β -Galaktosidase fusioniert ist.

III-2. Der Klonierungs- und Sequenzierungsvektor pTZ19(18)R

Dieser Plasmidvektor (Pharmacia), der in Abb.2 schematisch dargestellt ist, entspricht im Wesentlichen dem pUC19(18) (der zusätzlich vorhandene fl Replikationsursprung sowie der T7 Promotor fanden bei den hier durchgeführten Experimenten keine Verwendung).

Da das Plasmid die Operator/Promotor-Region des Lac-Operons sowie die kodierende Sequenz für die N-terminalen 57 Aminosäuren der β -Galaktosidase (in diesem Bereich erfolgte auch die Polylinkerinsertion) enthält, eignet er sich auch zur Expression von cDNA. cDNA-Fragmente, die im Leseraster des N-terminalen β -Galaktosidasefragments liegen, ein Signal für den Translationsstop besitzen und innerhalb des Polylinkers kloniert sind können als Fusionsproteine exprimiert werden. Der β -Galaktosidase-Fusionsanteil beträgt je nach der Position innerhalb des Polylinkers zwischen 11 und 27 Aminosäuren.

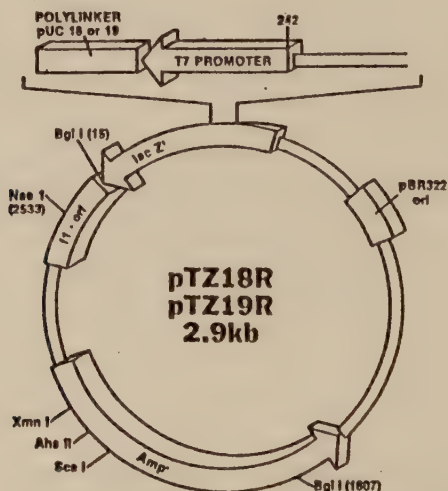


Abb.2: Schematische Darstellung des Klonierungs- und Sequenzierungsvektors pTZ19(18)R.

III-3. Bakterienstämme

E. coli Y1090r⁻

Genotyp: BNN96 hfLA150 [chr::Tn10]. (Young & Davis, 1983)

E. coli DH5

Genotyp: endA1, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), supE44, thi-1, lambda⁻, recA1, gyrA96, relA1, F⁻. (Hanahan, 1983)

E. coli XL1-Blue

Genotyp: endA1, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), supE44, thi-1, lambda⁻, recA1, gyrA96, relA1, (lac), [F', proAB, lacI^q2 M15, Tn10 (tet^R)]. (Hanahan, 1983)

III-4. Bakteriennährmedium (L-Medium)

1.0% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1.0% (w/v) NaCl

III-5. Das Anti-HITI-Antiserum

Das Anti-HITI-Antiserum aus Kaninchen sowie eine kleine Menge HITI (Rudolf Vogel, 1984) wurde uns von Dr. W. Müller-Esterl überlassen. Nur die Antiseren nach der ersten, zweiten und dritten Boosterung, sowie ein Anti-HITI-Antiserum von Prof. Heimbürger (Beringwerke, Marburg), nicht aber das Präimmunserum konnten HITI im indirekten ELISA-Test detektieren. Darüber hinaus wurde die Spezifität durch Western-Blots von humanem Citratplasma verifiziert.

III-6. Immunologische Reagenzien

ProtoBlotTM Immunoscreening System, Promega Biotec; Heidelberg

Anti-Kaninchen-IgG von Ziege (Fc), Konjugat mit alkalischer Phosphatase, Promega Biotec; Heidelberg

Biotinylierte Anti-Kaninchen-IgG vom Esel, Amersham

BSP-Komplex (präformierter Komplex aus Streptavidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase), Amersham

III-7. Enzyme

Die verwendeten Nukleinsäure modifizierenden Enzyme sowie die Restriktionsendonukleasen wurden, soweit dies im folgenden Text nicht anders erwähnt ist, von der Firma Boehringer Mannheim bezogen. Lysozym aus Hühnereiweiß war von der Firma Serva.

III-8. Häufig verwendete Puffer

Phagen-Verdünnungspuffer: 10mmol/l Tris-HCl pH 7.5, 10mmol/l MgCl₂

1 x SSC: 0.15mol/l NaCl, 0.015mol/l Natriumcitrat, pH 7.0

100 x Denhardt: 2% (w/v) BSA (Serumalbumin vom Rind) [Sigma, Fraktion V], 2% (w/v) Ficoll, 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon

1 x TBE: 0.1mol/l Tris-HCl, 0.083mol/l Borsäure, 1mmol/l EDTA; pH 8.6

1 x TBST: 10mmol/l Tris-HCl pH 8.0, 150mmol/l NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20

1 x TE: 10mmol/l Tris-HCl pH 7.5, 1mmol/l EDTA

1 x TNE: 10mmol/l Tris-HCl pH 7.5, 100mmol/l NaCl, 1mmol/l EDTA

IV. Methoden

IV-1. Optimieren der Antikörperkonzentrationen für das Sichten der Lambda-gt11 Expressionsgenbank

Das HITI-Antiserum wurde 1:10 mit E. coli-Lysat (hergestellt von einer E. coli Y1090r⁻-Übernachtskultur, die nach dem Abzentrifugieren in 1/10 des ursprünglichen Kulturvolumens 1 x TBST resuspendiert wurde und anschließend durch Ultraschallbehandlung lysoziert worden war) versetzt und 4h bei 14°C inkubiert; unlösliche Anteile wurden anschließend mit einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Auf Nitrocellulose-Filterstreifen (BA85 Membranfilter, 0.45µm, Schleicher & Schuell) wurden 10, 1, 0.1 und 0.01ng HITI aus entsprechend verdünnten, wäßrigen Lösungen aufgetragen. Nach dem Trocknen wurden diese Proben gegen verschiedene Verdünnungen von präadsorbiertem HITI-Antiserum (1:20-1:100) und biotinylierte Anti-Kaninchen-Ig (1:500-1:16000) unter den Bedingungen des späteren Sichtens der Genbank (Young et al., 1985, ProtoBlotTM Immunoscreening System, Promega Biotec, Heidelberg) getestet. Beim Detektionssystem mit Peroxidase (Young et al., 1985) wurde der BSP-Komplex (Streptavidin biotinylierter Meerrettichperoxidase-Komplex) in Verdünnungen von 1:500-1:2000 eingesetzt.

Zur negativen Kontrolle wurden auf einen Nitrocellulose-Filterstreifen neben HITI, wäßrige Lösungen beliebiger Proteine (siehe V-1.1, Abb.3) getropft (je 2µg) worauf die weitere Bearbeitung dieser Teststreifen dem oben beschriebenen Schema folgte.

IV-2. Charakterisierung der Lambda-gt11 Expressionsgenbank

IV-2.1 Herstellung der kompetenten Zellen

10ml L-Medium (0.2% Maltose) wurden in einem sterilen 50ml-Polypropylenröhrchen mit dem Abstrich einer Kolonie E. coli Y1090r⁻ angeimpft und die Zellen über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator vermehrt. Nach dem Abzentrifugieren der Kultur (5000g, 4°C, 10min) wurde das Zellsediment in 30ml Phagen-Verdünnungspuffer resuspendiert.

IV-2.2 Ausplattieren von Phagenverdünnungen

1ul der amplifizierten Genbank wurde zu 10ml Phagen-Verdünnungspuffer pipettiert und dann schrittweise um den Faktor 10 bis auf $1:10^{10}$ weiter verdünnt.

100ul der jeweiligen Verdünnung wurden mit 200ul kompetenten Zellen in einem sterilen 2.2ml Reaktionsgefäß vermischt, und 20min bei 37°C inkubiert, um die Adsorption der Phagen an die Zellen zu ermöglichen. Zu dieser Mischung wurden ≈ 2 ml L-Medium-Weichagar pipettiert (50°C) und sofort auf L-Medium-Agarplatten ($\varnothing=90$ mm; Maniatis, 1982), gleichmäßig verteilt. Nach fünfminütigem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Platten fünf Stunden bei 42°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zählung der Plaques.

IV-2.3 Bestimmung des Rekombinantenanteils

Da bei Lambda-gt11 die Insertion der Fremd-DNA innerhalb des lacZ-Gens erfolgt, lassen sich nicht-rekombinante Phagen (in Anwesenheit des β -Galactosidase-Substrats 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) und des Induktors Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid (IPTG)) durch die Bildung blauer Plaques nachweisen.

Die an *E. coli* adsorbierten Phagen wurden zu 2.5ml L-Medium-Weichagar (50°C), der kurz zuvor mit 50ul 2% (w/v) X-Gal-Lösung (in Dimethylformamid) versetzt worden war, pipettiert. Diese Mischung wurde auf L-Medium-Agarplatten verteilt und 3.5h bei 42°C inkubiert. Dann wurden in 10mmol/l wäßriger IPTG-Lösung getränkte Nitrocellulosefilter auf die Weichagarschicht gelegt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach dem Abnehmen der Filter konnten weiße und blaue Plaques ausgezählt werden.

IV-3. Immunologisches Sichten der Lambda-gt11 Expressionsbank

Für jeweils einen Durchgang wurden $1.5 \cdot 10^7$ - $2.0 \cdot 10^7$ pfu (plaque-forming units) auf 10 - 15 L-Medium Agarplatten ($\varnothing=90$ mm) ausplattiert. Das weitere Vorgehen war beim Detektionssystem mit Peroxidase entsprechend dem von Young et al., 1985 (siehe V-1.1 bzgl. der eingesetzten Antikörperverdünnungen).

Beim Detektionssystem mit alkalischer Phosphatase wurde analog der Anleitung zum ProtoBlot™ Immunoscreening System von Promega Biotec, Heidelberg verfahren (siehe V-1.1 bzgl. der eingesetzten Antikörperverdünnungen).

Phagen, die positive Signale lieferten, wurden durch Aufnehmen der Plaques in Lambda-Verdünnungspuffer, wiederholtes Replattieren und erneutes, immunologisches Sichten vereinzelt.

IV-4. Sichten der Lambda-gt11 cDNA-Bank durch Nukleinsäure-hybridisierung

Hierfür wurden für jeweils einen Durchgang $4 \cdot 10^8$ - $5 \cdot 10^8$ pfu auf 10 L-Medium-Agarplatten ($\varnothing=150\text{mm}$) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dann einer Vorschrift der Firma CLONTECH (Palo Alto, USA), die im wesentlichen auf einer Anleitung von Benton und Davis (1977) basiert. Die Phagen wurden hierbei auf Schleicher & Schuell Nitrocellulose-Membranfilter BA 85/21, $0.45\mu\text{m}$, $\varnothing=137\text{mm}$ transferiert, diese 60 Sekunden in 1.5mol/l NaCl , 0.5mol/l NaOH , anschließend 8 Minuten in 1.5mol/l NaCl , $0.5\text{mol/l Tris}\cdot\text{HCl}$, pH 8.0 und schließlich 5 Minuten in $3 \times \text{SSC}$ inkubiert. Nach dem Trocknen auf Whatman 3MM Papier wurden sie 2 Stunden bei 80°C im Vakuumofen gebacken.

Die Vor- und Hybridisierungsreaktionen wurden in einem "Roller-Ofen" (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) in Macrolan-Zylindern durchgeführt. Das Vorhybridisieren der gebackenen Nitrocellulosefilter erfolgte in $10\text{ml} / 5 \text{ Filter } 3 \times \text{SSC}$, $3 \times \text{Denhardt}$, 0.1% SDS und $100\mu\text{g/ml}$ beschallter Lachs-Spermien-DNA (Pharmacia), bei 65°C , 2h. Zur Hybridisierung wurden anschließend von der, durch $2'$ -Deoxycytosin $5'$ -O-(1-(α - ^{32}P)triphosphat) (Amersham) mit dem "Random Primed DNA Labeling Kit" (Boehringer Mannheim) markierten, hitzedenaturierten Sonde (siehe V-3, Abb.12), $1 \cdot 10^6 \text{cpm/ml}$ zur Vorhybridisierlösung gegeben. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte über Nacht, innerhalb eines Temperaturgradienten von 65°C auf 37°C , was durch entsprechendes Umschalten des Ofenthermostaten von 65°C auf 37°C erreicht wurde. Die Filter wurden bei Raumtemperatur zweimal in $3 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, zweimal in $1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS und zweimal in $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS gewaschen. Nach dem

Trocknen der Filter, erfolgte die Autoradiographie über Nacht bei -70°C mit einer Cronex[®] Quanta III Verstärkerfolie (DU PONT) und einem Kodak XAR5 Film. Phagen, die Hybridisierungssignale lieferten, wurden durch Replattieren und erneutes Hybridisieren vereinzelt.

IV-5. Koloniehybridisierung mit Oligonukleotiden

Die Transformationsansätze von Ligierungsexperimenten (siehe IV-7 und IV-14) wurden auf Gene Screen Plus[™] Membranfiltern (DU PONT) ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und davon Replikplatten hergestellt. Die Bakterienkolonien auf den Filtern wurden nun nach der Vorschrift für die Koloniehybridisierung der Firma Schleicher & Schuell (1983), die einer Anleitung von Grunstein und Hogness (1975) entspricht, lysiert.

Das radioaktive Markieren der Oligonukleotide (siehe z.B. V-4) erfolgte mit Adenosin 5'-O-(3-[^{32}P]triphosphat) (Amersham) und T4 Polynukleotidkinase (Boehringer Mannheim) nach einer Vorschrift für das Markieren von glatten oder zurückgezogenen 5'-Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle (Maniatis, 1982). Markierte DNA wurde von Protein und nicht umgesetztem Adenosintriphosphat durch Affinitäts-Chromatographie an NENSORB[™] (NEN Research Products, DU PONT) gereinigt.

Das Vorhybridisieren und Hybridisieren wurde, wie oben beschrieben, im "Roller-Ofen" nach Wallace et al. (1981) durchgeführt, wobei die markierte Oligonukleotid-Sonde (siehe z.B. V-4) zu einer Endkonzentration von 10ng/ml zugegeben wurde.

Die Hybridisierungsreaktion erfolgte über Nacht, innerhalb eines Temperaturgradienten von 55°C auf 37°C , was durch entsprechendes Umschalten des Ofenthermostaten von 55°C auf 37°C erreicht wurde.

Nach dem Trocknen der Filter, erfolgte die Autoradiographie über Nacht bei -70°C mit einer Cronex[®] Quanta III Verstärkerfolie (DU PONT) und einem Kodak XAR5 Film.

IV-6. Präparieren von Lambda Phagen-DNA

Vereinzelte Phagen wurden zunächst in Flüssigkultur (Silhavy et al., 1984) amplifiziert, anschließend die DNA durch Fällung mit

Polyethylenglycol und Phenolextraktion isoliert ("Recombinant DNA Techniques", EMBO-Practical Course August 5-18, 1984 und Maniatis, 1982).

Im Unterschied zu den dort gegebenen Anweisungen erfolgte die RNase- und DNase-Behandlung einer 20ml Kultur durch Zugabe von 25µl einer RNase/DNase-Mischung, bestehend aus einer wäßrigen Lösung von 20mg/ml DNaseI, 20mg/ml RNaseA (Boehringer Mannheim) und 10µl/ml RNaseT1 (BRL) nach dem Abzentrifugieren der Zellbruchstücke. Die Inkubationsdauer betrug 45 Minuten bei 37°C. Hierauf wurden 20ml 20% (w/v) Polyethylenglykol/2mol/l NaCl zugegeben und über Nacht bei 0°C inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde das Phagensediment in 0.75ml Lambda-Verdünnungspuffer suspendiert, mit 10µl 10% SDS und 10µl 0.5mol/l EDTA pH 8.0 versetzt, 15 Minuten bei 65°C inkubiert, anschließend einmal mit demselben Volumen Phenol (H₂O gesättigt), einmal mit demselben Volumen Phenol (H₂O gesättigt)/Chloroform (1:1) (v/v), einmal mit Chloroform extrahiert und die Phagen-DNA schließlich mit Isopropanol gefällt.

Die so erhaltenen DNA-Präparationen wurden zum Teil noch durch Chromatographie an Hydroxylapatit (BIO RAD) (Ivanov et al., 1985) und an NENSORBTM (NEN Research Products, DU PONT) weiter gereinigt.

IV-7. Transformation kompetenter E. coli-Zellen mit Plasmid-DNA

Ligierungsansätze (siehe IV-14) wurden dazu 1:3-1:5 mit H₂O verdünnt, bzw. von bereits isolierter Plasmid-DNA (siehe IV-8 und IV-9) 1-5ng eingesetzt. Die Transformation von 20µl kompetenten E. coli DH5- bzw. XL1-Blue-Zellen (BRL bzw. Stratagene) erfolgte dann mit 1µl der jeweiligen DNA-Lösung. Die Vorgehensweise hierbei entsprach der vom Hersteller der kompetenten Bakterien angegebenen. Der Transformationsansatz (120µl) von XL1-Blue-Zellen wurde vor dem Ausplattieren auf L-Medium-Agar (100µg/ml Ampicillin) mit 10µl 100mmol/l wäßriger IPTG-Lösung und 50µl 2% X-Gal in Dimethylformamid versetzt. Die ausplattierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

IV-8. Isolierung von Plasmid-DNA

Jeweils über Nacht bei 37°C gewachsene Bakterienkolonien wurden in 10ml L-Medium (100µg/ml Ampicillin) in 50ml-Polypropylenröhrchen über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Plasmidisolierung nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly, (1979) (vergleiche Heinrich, 1985).

IV-9. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Die Methode basiert im wesentlichen ebenfalls auf der Methode von Birnboim und Doly (1979). Alle hier verwendeten Puffer und Lösungen haben die gleiche Zusammensetzung wie bei Heinrich (1985).

0.5l L-Medium (100µg/ml Ampicillin) wurden mit einer Kolonie eines Klons angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Hierauf wurden die Zellen abzentrifugiert (4000g, 4°C, 10min), das Zellsediment in 12 ml 1 x TNE resuspendiert, die Zellen wiederum abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurde das Zellsediment in 3.2ml Lysozymbelösung (5mg/ml) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 6.4ml SDS/NaOH-Lösung. Nach dem Aufklaren der Suspension wurden 4.8ml Natriumacetatlösung (3mol/l, pH 4.8) zugegeben, gut geschüttelt und 10min bei 0°C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (35000g, 4°C, 15min) wurde mit demselben Volumen Phenol (H₂O gesättigt) / Chloroform (1:1) (v/v) versetzt, geschüttelt, wiederum zentrifugiert (6000g, 20°C, 5min), die wässrige Phase mit dem doppelten Volumen kaltem Ethanol (-20°C) versetzt und 15min bei 0°C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (35000g, 4°C, 15min), wurde das erhaltene Sediment im Vakuum getrocknet, anschließend in 8ml 1 x TE (pH 7.5) gelöst, mit 100µl RNaseA-Lösung und 2µl RNaseT1 (BRL) versetzt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf erfolgte die Zugabe von 800µl Natriumacetatlösung (3mol/l, pH 4.8). Anschließend wurde, wie oben beschrieben, mit Phenol/Chloroform und noch einmal mit Chloroform extrahiert, die Plasmid-DNA schließlich mit Ethanol gefällt und in 1ml 1 x TE (pH 7.5) gelöst.

IV-10. Entfernung von Enzymen aus Reaktionsansätzen mit DNA

Der Reaktionsansatz wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetatlösung (3mol/l, pH 4.8) versetzt und mit einem gleichen Volumen Phenol (H_2O gesättigt)/ Chloroform (1:1) (v/v), anschließend noch einmal mit Chloroform extrahiert. Nach der Zugabe von 2 Volumen Ethanol ($-20^{\circ}C$) einer Inkubationszeit von 15min bei $0^{\circ}C$, 15-minütiger Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge, wurde das erhaltene DNA-Sediment mit 1ml 70% Ethanol ($-20^{\circ}C$) gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

IV-11. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen waren von Boehringer Mannheim, New England Biolabs oder BRL. Der jeweilige Inkubationspuffer wurde durch Mischung von 10 x LS (60mmol/l Tris-HCl pH 7.5, 60mmol/l $MgCl_2$, 10mmol/l Dithiothreitol), 10 x MS (10 x LS, 0.6mol/l NaCl) und 10 x HS (10 x LS, 1.5mol/l NaCl) hergestellt. Das Volumen des Spaltungsansatzes betrug pro μg eingesetzter DNA 10 μl .

IV-12. Dephosphorylierung der 5'-Enden von doppelsträngiger DNA

1-5pmol DNA wurden in 100 μl 50mmol/l Tris-HCl pH 8.0 gelöst, mit 24U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) (Boehringer Mannheim) versetzt und 20min bei $37^{\circ}C$ (bei glatten oder vorstehenden Enden) oder 30min bei $60^{\circ}C$ (bei zurückgesetzten Enden) inkubiert. Das Enzym wurde schließlich durch Phenolextraktion und anschließende Ethanol-fällung der DNA entfernt.

IV-13. Glätten von 3'- und 5'-überstehenden Enden von doppelsträngiger DNA

IV-13.1 Eliminieren überstehender Enden mit Mung Bean-Nuklease

Es wurden 2-10 μg DNA (1-10pmol freie Enden) mit 10U Mung Bean-Nuklease (Pharmacia) in 100 μl des vom Hersteller angegebenen Puffers 10min bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung der DNA entfernt.

IV-13.2 Auffüllen von 3'zurückgezogenen Enden mit E. coli DNA-Polymerase [Klenow-Fragment]

Es wurden $\approx 2\text{pmol}$ freie DNA-Enden in $25\mu\text{l}$ Puffer (50mmol/l Tris-HCl, pH 7.5; 10mmol/l MgSO_4 ; 0.1mmol/l Dithiothreitol; 0.5mg/l BSA), mit jeweils 250pmol/l der notwendigen 2'-Deoxyribonukleotridtriphosphate und 2U Klenow-Fragment (Boehringer Mannheim), 30min bei Raumtemperatur, inkubiert. Die Entfernung des Enzyms erfolgte anschließend durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung der DNA.

IV-14. Ligieren von DNA

Die Ligierungsreaktion erfolgte im allgemeinen in $10\text{--}50\mu\text{l}$ Ligasepuffer (20mmol/l Tris-HCl, 10mmol/l MgCl_2 , 10mmol/l Dithiothreitol, 0.6mmol/l ATP; pH 7.6) mit 1 Weiss-Unit T4 DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) bei 14°C über Nacht.

DNA mit überstehenden Enden wurde bei Konzentrationen von $\approx 5\mu\text{g/ml}$ zirkularisiert. Bei glatten Enden wurde die Konzentration auf $10\text{--}15\mu\text{g/ml}$ erhöht, der Ligasepuffer noch zu 7% (w/v) mit PEG 6000 versetzt und die Ligasemenge verdreifacht.

Sollte ein DNA-Fragment (überstehende Enden) mit einem linearisierten und dephosphorylierten Plasmid-Vektor ligiert werden, betrug die DNA-Konzentration $35\mu\text{g/ml}$, wobei die molare Vektorkonzentration der $2\text{--}3$ -fachen des Fragments entsprach.

Bei gleicher Situation mit glatten Enden wurden 3 Weiss-Units T4 DNA-Ligase eingesetzt, der Ligasepuffer zu 7% (w/v) mit PEG 6000 versetzt und die DNA-Konzentration auf $50\mu\text{g/ml}$ erhöht, wobei Vektor und zu ligierendes Fragment in äquimolaren Konzentrationen vorlagen.

IV-15. Gel-Elektrophorese von DNA

Die analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte auf horizontalen Agarose- und vertikalen Polyacrylamid-Gelen (Maniatis, 1982). Als Gel- und Laufpuffer wurde $1 \times \text{TBE}$ verwendet. Dieser war bei Agarose-Gelen mit 1mg/l Ethidiumbromid versetzt. Bei Polyacrylamid-Gelen wurde die DNA nach dem Lauf mit diesem Puffer eingefärbt. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit $1/5$ Volumen Probenpuffer (60% Sucrose, 0.25% Bromphenolblau) versetzt. Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte durch

den Vergleich mit Marker-DNA-Restriktionsfragmenten bekannter Länge ("Lambda DNA/HindIII" und "ØX174 RF-DNA/HaeIII", BRL).

IV-16. Isolierung von DNA-Restriktionsfragmenten aus Polyacrylamid- oder Agarosegelen

IV-16.1 Elektroelution

Zur Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen wurde das Gerät "BIOTRAP" (Schleicher & Schuell) verwendet, wobei entsprechend der Methodenbeschreibung des Herstellers verfahren wurde.

IV-16.2 Elektrophorese auf DE 81-Papier

Nach Trennung der Fragmente auf einem horizontalen Agarosegel wurde jeweils vor und hinter der bei 302 nm, sichtbaren, mit Ethidiumbromid gefärbten Bande eingeschnitten und je ein Stück DE 81 Papier (Whatman) eingeschoben, worauf die Elektrophorese für 5min fortgesetzt wurde. Das in Laufrichtung vor der Bande eingefügte Papierstückchen wurde anschließend wieder aus dem Gel entfernt und zweimal, unter starkem Schütteln, in 200µl 1.5mol/l NaCl inkubiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden nun mit 1/10 Volumen Natriumacetatlösung (3mol/l, pH 4.8) versetzt, phenolisiert, mit Chloroform extrahiert und die DNA schließlich mit Ethanol gefällt. Das erhaltene DNA-Sediment wurde noch zweimal mit 70% Ethanol (-20°C) gewaschen und im Vakuum getrocknet (Thiele et al., 1988).

IV-17. Sequenzieren von doppelsträngiger Plasmid-DNA

DNA-Sequenzen von doppelsträngiger Plasmid-DNA wurden nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al. 1977) erhalten (Chen & Seeburg, 1985). Es wurde hierfür die E. coli DNA-Polymerase [Klenow-Fragment] (GemSeq™ Riboprobe Gemini™ Sequencing System, Promega Biotec; Heinrich, 1985) oder AMV reverse Transkriptase (Graham et al., 1986) eingesetzt. Als Primer für das Plasmid pTZ19R fanden der "T7 Promotor Primer" (Promega Biotec), der "Reverse Sequencing Primer" (Pharmacia) und ein, im Labor zur Verfügung stehendes Oligonukleotid (5'-TGTAACGACGGCCAGTG-3'), das im wesentlichen dem

"M13/pUC Sequencing primer" von Boehringer Mannheim entspricht, routinemäßig Verwendung. Die Inkubationstemperatur betrug bei Verwendung des Klenow-Enzyms immer 37°C. Die verwendeten Nukleotidmischungen waren, wie folgt verändert:

gegenüber Heinrich (1985)

/l	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix
dCTP	100 µmol	10 µmol	100 µmol	100 µmol
dGTP	100 µmol	100 µmol	5 µmol	100 µmol
dTTP	100 µmol	100 µmol	100 µmol	5 µmol
ddATP	25 µmol			
ddCTP		90 µmol		
ddGTP			100 µmol	
ddTTP				300 µmol

bzw. gegenüber Graham et al. (1986)

dN: 0.5 mmol/l dNTP (N=C, G, T)
 ddA: 0.005 mmol/l ddATP
 ddC: 0.125 mmol/l ddCTP
 ddG: 0.250 mmol/l ddGTP
 ddT: 0.500 mmol/l ddTTP

Die radioaktive Markierung erfolgte entweder durch 2'-Deoxyadenosin 5'-O-(1-[α - 32 P]triphosphat) oder durch 2'-Deoxyadenosin 5'-O-(1-[α - 35 S]thiotriphosphat). Die Analyse der Sequenzreaktionen erfolgte auf einer Macrophor-Einheit von LKB, mit denaturierenden Polyacrylamidgelen. Routinemäßig wurden folgende Gele verwendet:

5% Polyacrylamid, 8mol/l Harnstoff in 1 x TBE pH 8.6; 0.1-0.4mm Keilgel; Elektrophoresebedingungen: 3000V, 50°C, 90min.

6% Polyacrylamid, 8mol/l Harnstoff in 1 x TBE pH 8.6; 0.2-0.4mm Keilgel; Elektrophoresebedingungen: 2500V, 50°C, 120min.

Aus den Gelen wurde nach der Elektrophorese mit 10% Essigsäure der Harnstoff entfernt. Nach dem Trocknen der Gele erfolgte die Autoradiographie über Nacht mit einem Kodak XAR 5 Film.

IV-18. ExonukleaseIII-Degradation in pTZ19R klonierter cDNA

15µg Plasmid-DNA wurden aufeinanderfolgend mit zwei Restriktionsendonukleasen verdaut, wobei die erste nur im Polylinker des pTZ19R schnitt und dort 3'-überstehende Enden lieferte, die zweite innerhalb der insertierten cDNA, möglichst nahe des Polylinkers oder innerhalb dessen und dort ein glattes, oder 3'-zurückgezogenes Ende erzeugte. Hierauf erfolgte die ExonukleaseIII-Degradation des cDNA-Fragments unter den Bedingungen von Henikoff (1984), jedoch mit den im "Bluescript Exo-Mung DNA Sequencing System" (Stratagene), angegebenen Puffern (für ExonukleaseIII: 50mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 5mmol/l MgCl₂, 10µg/ml tRNA; für Mung Bean-Nuklease: 30mmol/l NaAc, pH 5.0, 50mmol/l NaCl, 1mmol/l ZnCl₂, 5% (v/v) Glycerin) bei 30°C. Anders auch als bei Henikoff (1984) beschrieben, wurden die 5'-überstehenden Enden nicht mit Nuklease S1, sondern mit Mung Bean-Nuklease (Pharmacia) abgedaut. Nach Religierung der verkürzten Plasmid-DNA (Henikoff, 1984) wurde 1µl des jeweiligen Ligierungsansatzes dazu verwendet um kompetente E. coli DH5-Zellen von (BRL) zu transformieren. Befanden sich jedoch die Schnittstellen der anfänglich verwendeten Restriktionsendonukleasen beide auf dem Polylinker des pTZ19R (sodaß der zweite Verdau mit großer Wahrscheinlichkeit unvollständig war), wurden die Ligierungsansätze vor der Transformation mit einer Restriktionsendonuklease inkubiert, welche die DNA einmal, in einem bekannten, abzubauenen Bereich schneiden sollte. Alternativ erfolgte die Koloniehybridisierung transformierter E. coli DH5-Zellen mit einem Oligonukleotid aus der bereits bekannten, abzubauenen Sequenz. Von 5-10 Kolonien jedes Transformationsansatzes wurden analytische Mengen Plasmid-DNA isoliert. 1µg der jeweils erhaltenen DNA wurde einmal mit EcoRI und einmal mit HindIII verdaut, um nach Analyse der Spaltprodukte auf einem horizontalen 1% Agarosegel durch Größenvergleich mit Marker-DNA-Restriktionsfragmenten bekannter Länge ("Lambda HindIII Digest", BRL) Aussagen über das Ausmaß der Verkürzung treffen zu können, bzw. um den Erhalt des T7 Promotors und damit die Sequenzierbarkeit zu bestätigen. Alternativ erfolgte eine T-Spur-Analyse mit 0.5µg Plasmid-DNA und 1pmol "T7 Promotor Primer" nach der Methode von Heinrich (1985).

IV-19. Aufarbeitung und Reinigung spezifischer Oligonukleotide für die Sequenzanalyse

Routinemäßig wurde die Synthese der Oligonukleotide am "Gene Assembler" von Pharmacia und ihre Reinigung von FrI. Gabriele Zuckriegl durchgeführt. Soweit sie selbst aufgearbeitet wurden, wurde wie folgt verfahren:

Die Abspaltung der Syntheseprodukte (18- bis 22-mer) vom Träger ("Gene Assembler" Support A,C,G oder T, $0.2\mu\text{mol}$ ", Pharmacia) erfolgte durch Inkubation der Kassetten in 1ml 25% wäßrigem Ammoniak 16h bei 50°C . Die erhaltene Lösung wurde über eine "NAP-10"-Säule (Pharmacia), äquilibriert mit 100mmol/l Triethylammoniumacetat, pH 7.0/ 5% (v/v) Acetonitril, vom Ammoniak befreit. Lagen die Zyklusaussbeuten bei der Synthese über 98%, so konnten die Oligonukleotide nach Gefriertrocknung und entsprechender Verdünnung mit Wasser ($\text{OD}_{260}=1.0-1.2$) direkt zum Sequenzieren eingesetzt werden (Sanchez-Pescador et al., 1984). Waren die Zyklusaussbeuten geringer, oder ergaben sich trotz guter Syntheseleistung Probleme beim Sequenzieren, so wurden die Oligonukleotide über ein 20%iges, denaturierendes Polyacrylamidgel ($380\text{mm} \times 200\text{mm} \times 0.4\text{mm}$), mit 1 x TBE (pH 8.6) als Lauffuffer, gereinigt. Hierzu wurden $100\mu\text{g}$ -Aliquots nach Gefriertrocknung in $20\mu\text{l}$ Probenpuffer [98% (v/v) Formamid, 10mmol EDTA, pH 8.0] aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Die Abtrennung von kürzeren Fragmenten erfolgte bei 400V innerhalb von 20h. Nun wurde das Gel auf eine, mit Frischhaltefolie abgedeckte, DC-Fertigplatte, Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck) gelegt. Durch Bestrahlung mit einer 254nm UV-Lampe wurden die Banden sichtbar. Die jeweils größte wurde ausgeschnitten, die Gelstückchen verrieben, in 5ml Einwegspritzen, deren Boden zuvor mit einer Lage 2MM Whatman Filterpapier ausgelegt worden war, gefüllt, und anschließend die Oligonukleotide mit 1ml H_2O langsam eluiert. Die so erhaltenen Lösungen wurden durch Chromatographie auf "NAP-10"-Säulen (Pharmacia) vom Harnstoff befreit, worauf jeweils ein Aliquot auf die zum Sequenzieren notwendige Konzentration ($\text{OD}_{260}=0.8$; Sanchez-Pescador et al., 1984) mit Wasser verdünnt wurde.

IV-20. Expression in pTZ19R klonierter cDNAs in E. coli

Die Expression der in pTZ19R klonierten cDNAs erfolgt unter lac-Kontrolle. Mit geeigneten Plasmiden wurden kompetente E. coli XL1-Blue Zellen transformiert. Einzelne Kolonien wurden jeweils in 10ml L-Medium (100µg/ml Ampicillin) überimpft und bis zu einer optischen Dichte $OD_{578} = 0.5$ amplifiziert. 20µl dieser Kultur wurden nun zu 2ml L-Medium (100µg/ml Ampicillin, 1 mmol/l IPTG) pipettiert um die Expression zu induzieren, und 5 h bei 37°C inkubiert. Hierauf wurde von 1ml der induzierten Kultur die Zellen in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert (30s), mit 1 x TNE gewaschen, in 200µl Lysepuffer (75 mmol/l Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol) nach Laemmli (1970) aufgenommen und anschließend 3min gekocht.

IV-21. SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Gereinigte Proteine, sowie Proteine aus Zelllysaten wurden nach der Reduktion im entsprechenden Probenpuffer und dem Versetzen mit 1/5 Volumen BFX [0.25% (w/v) Bromphenolblau, 30% (w/v) Ficoll, 0.25% (w/v) Xylencyanol] auf vertikalen 140mm x 140mm x 1.5mm SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, 1970).

IV-22. Proteintransfer aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Dies erfolgte mit dem Biometra "Fast Blot System" (Biometra, Göttingen), "halbtrocken", auf elektrochemischem Weg (Kyhse-Andersen, J., 1984) nach der Vorschrift des Herstellers auf Nitrozellulosemembranen (BA 85, 0.45µm, Schleicher & Schuell).

IV-23. Immunodetektion von Proteinen im Western-Blot

Das immunologische Anfärben einzelner Proteinbanden im Western-Blot erfolgte mit HIT1-Antiserum, das an E. coli-Lysat präadsorbiert worden war und dem "ProtoBlot™ Immuno-blotting System" (Promega Biotec, Heidelberg) unter optimierten Bedingungen (s.a. 1.1), nach den Angaben des Herstellers.

IV-24. Analyse der DNA-Sequenzdaten

Die Sequenzdaten wurden mit dem "MicroGenie[®] Sequence Analysis Programm" Version 4.0 (Fa. Beckmann, München; Queen & Korn, 1984) und der jeweils letzten Version der GenBank- und NBRF-Datenbanken (National Biomedical Research Foundation, Protein Identification Resource) gesammelt, geordnet und analysiert.

V. Ergebnisse

V-1 Sichten der Lambda-gt11 cDNA-Expressionsbank mit HITI-Antiserum

V-1.1 Optimieren der Antikörperkonzentrationen

Eine humane Leber-cDNA-Expressionsbank in Lambda-gt11 wurde mit Antiserum gegen humanen Inter- α -Trypsininhibitor immunologisch gesichtet. Hierzu wurde sowohl ein Detektionssystem mit Meerrettichperoxidase als auch eines mit alkalischer Phosphatase eingesetzt.

Bei folgenden Antikörperverdünnungen konnten die jeweiligen Detektionssysteme 1ng HITI gerade noch erfassen (siehe auch Abb.3):

	Detektion mit Peroxidase	Detektion mit alkalischer Phosphatase
HITI-Antiserum	1:50	1:90
(präadsorbiert an <u>E. coli</u> Y1090r ⁻ -Lysat)		
Anti-Kaninchen-IgG (biotinyliert)	1:800	
Anti-Kaninchen IgG AP-Konjugat		1:7500
BSP-Komplex	1:500	

Humanes Albumin (2 μ g) und E. coli Y1090r⁻-Lysat ergaben noch ein sehr schwaches Signal, wogegen mit jeweils 2 μ g TPCK-Trypsin, Trypsininhibitor aus Soya-Bohne und Kallikrein keine Farbreaktion mehr beobachtet werden konnte (siehe Abb.3).

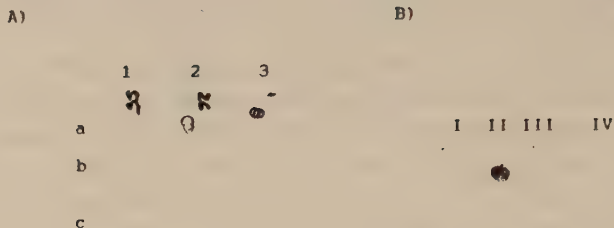


Abb.3: A) Nitrozellulose-Filterstreifen auf die 100ng (a), 10ng(b) und 1ng(c) HITI geblottet waren und die in Antikörperverdünnungen von (1): präadsorbiertes Anti-HITI-Antiserum 1:80, biotinylierte Anti-Kanninchen-Ig 1:12000, BSP-Komplex 1:500; (2): präadsorbiertes Anti-HITI-Antiserum 1:70, biotinylierte Anti-Kanninchen-Ig 1:4000, BSP-Komplex 1:500; (3): präadsorbiertes Anti-HITI-Antiserum 1:50, biotinylierte Anti-Kanninchen-Ig 1:1000, BSP-Komplex 1:500 inkubiert worden waren. B) Nitrozellulose-Filterstreifen auf den (I) 2µg Trypsininhibitor aus Soya-Bohne, (II) 2µg HITI, (III) 2µg Humanes Albumin, (IV) 2µg Kallikrein geblottet waren und der in den unter (3) beschriebenen Antikörperverdünnungen inkubiert worden war.

V-1.2 Charakterisierung der Lambda-gt11 cDNA-Expressionsbank

Der Phagentiter der amplifizierten Genbank betrug $2.5 \cdot 10^{10}$ pfu pro ml, wobei der Rekombinantenanteil zu $\approx 60\%$ bestimmt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Bei einem Sichtungsdurchgang wurden jeweils $\approx 1.2 \cdot 10^5$ rekombinante Phagen ausplattiert.

V-1.3 Detektion der ersten HITI-cDNA-Klone im Phagen Lambda-gt11

Nach mehreren Versuchen mit dem Detektionssystem mit Peroxidase konnten 11 sehr schwach vom Untergrund sich abhebende, HITI-positive Signale erhalten werden. Das Vereinzeln dieser Phagen war jedoch wegen der geringen Farbintensitätsunterschiede zwischen der antigenspezifischen Bindung und der unspezifischen Bindung von Antikörpern an E. coli-Proteine nur mit dem empfindlicheren Detektionssystem mit alkalischer Phosphatase möglich (Promega Notes, Number 3, Dec. 1985). Nach Sichtung von 1.2×10^5 Phagen konnten mit dem alkalischen Phosphatasesystem letztlich acht unabhängige Phagenklone erhalten werden.

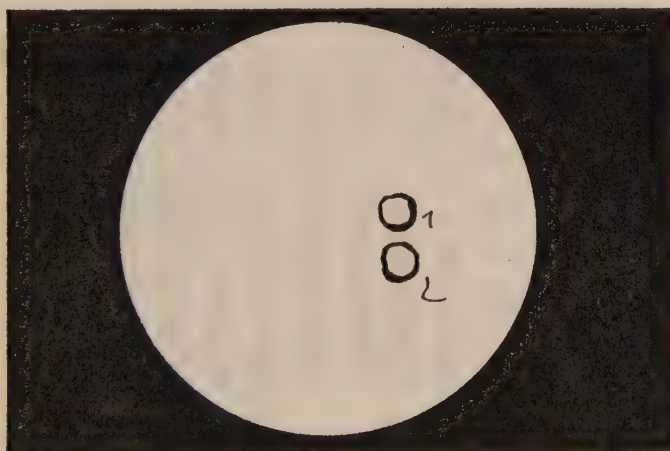


Abb.4: Nitrozellulosefilter, der das Vereinzeln positiver Phagen belegt. Signale von HITI-positivem Protein (1, 2), das vom Detektionssystem mit alkalischer Phosphatase erkannt wurde hebt sich deutlich vom Untergrund ab.

V-1.4 Vorläufige Charakterisierung der ersten HITI-cDNA-Klone durch partielle Restriktions- und Sequenzanalyse

Die acht Phagenklone wurden jeweils in Flüssigkultur vermehrt, wobei die Phagenlysate im allgemeinen Titer von $\approx 1 \cdot 10^{10}$ pfu/ml aufwiesen. Aus 20ml solcher Lysate konnten 25-50 μ g Phagen-DNA isoliert werden. Die cDNA-Insertion kann aus dem Lambda-gt11 Vektor durch Verdau der DNA mit der Restriktionsendonuklease EcoRI herausgeschnitten werden (siehe auch III-1). Durch den EcoRI-Verdau der acht Phagenklone und anschließende Gelelektrophorese (Abb.5) konnte gezeigt werden, daß sich die Größen der insertierten cDNA-Fragmente zwischen 1.0 und 2.3kbp bewegten.

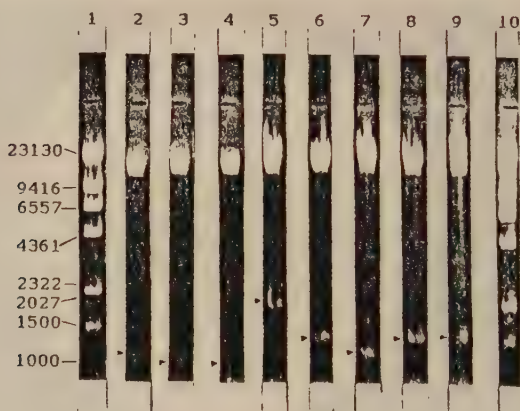


Abb.5: Gelelektrophorese (1%iges Agarosegel) des EcoRI-Verdaus der acht HITI-Phagenklone. In den Spuren 1 und 10 ist als Größenmarker "Lambda HindIII Digest™" aufgetragen. In den Spuren 2 bis 4 ist die DNA der Klone HITI-1.1, HITI-1.2 und HITI-1.3, in der Spur 5 die DNA des Klons HITI-2.1 und in den Spuren 6 bis 9 die DNA der Klone HITI-3.1, HITI-3.2, HITI-3.3 und HITI-3.4 aufgetragen.

Versuche, die cDNA-Insertionen direkt im Lambda-gt11-Vektor nach der Methode von Zagursky et al. (1985) zu sequenzieren scheiterten, da der käufliche "Lambda-gt11 Primer (forward) 15MER" von New England Biolabs aufgrund seiner unzureichenden Länge zu unspezifisch hybridisierte und dadurch sich überlagernde Sequenzen lieferte (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Methode des Subklonierens in Plasmid-DNA, hier pTZ19R (siehe auch III-2), und der direkten Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA gewählt (Chen & Seeburg, 1985).

Dazu wurde die DNA der Phagenklone sowie Plasmid-DNA pTZ19R mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut und die 5'-überstehenden Enden der pTZ19R-DNA anschließend dephosphoryliert. Nach Ligierung und Transformation kompetenter Zellen (*E. coli* XL1-Blue) konnten positive cDNA-Plasmidklone durch Verdau der isolierten DNA mit der Restriktionsendonuklease EcoRI nachgewiesen werden, worauf bei jeweils einem dieser Klone die cDNA-Insertion vom 5'- und 3'-Ende her sequenziert wurde (mit dem T7 Promotor Primer und dem M13/pUC Sequencing Primer entsprechenden Oligonukleotid).

Aufgrund der Sequenzdaten war es durch Sequenzvergleich möglich, die cDNA-Klone in drei voneinander unabhängige Gruppen (Gruppe 1 = HITI-1 mit den cDNA-Fragmenten HITI-1.1 bis HITI-1.3, Gruppe 2 = HITI-2 mit dem cDNA-Fragment HITI-2.1 und Gruppe 3 = HITI-3 mit den cDNA-Fragmenten HITI-3.1 bis HITI-3.4) einzuteilen, da jede aus den cDNA-Sequenzen abgeleitete mRNA 3'-terminal, 13-14Bp stromaufwärts einer poly(dA)-Sequenz, ein Polyadenylierungssignal besitzt (Abb.6).

HITI-1.1	(AATAAA) ERIXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXpAERI
HITI-1.2	(AATAAA) ERIXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXpAERI
HITI-1.3	(AATAAA) ERIXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXpAERI
HITI-2.1	(AATAAA) ERIYYpAERI
HITI-3.1	(ATTAAA) ERIZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZpAERI
HITI-3.2	(ATTAAA) ERIZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZpAERI
HITI-3.3	(ATTAAA) ERIZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZpAERI
HITI-3.4	(ATTAAA) ERIZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZpAERI

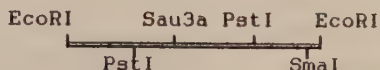
Abb.6: Schematische Zusammenstellung der drei Gruppen (HITI-1, HITI-2, HITI-3) von HITI-cDNA Klonen. Gleiche Buchstaben (X, Y, Z) stehen für gleiche Sequenzen, ein Buchstabe steht für 50Bp Nukleinsäuresequenz, ERI steht für die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease EcoRI, pA steht für die poly(dA)-Sequenzen und (AATAAA) bzw. (ATTAAA) geben die vorhandenen Polyadenylierungssignale an.

V-2 Vollständige Charakterisierung der partiellen HITI-Plasmidklone HITI-1.2, HITI-2.1 und HITI-3.1 durch Restriktions- und Sequenzanalyse der cDNA-Fragmente sowie durch Western-Blots ihrer Expressionsprodukte

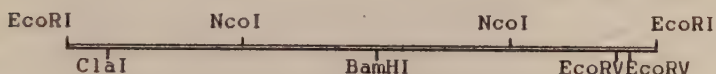
V-2.1 Restriktionsanalyse

Mit den genannten Plasmidklonen jeder Gruppe wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt, wobei Informationen über mögliche Spaltstellen für das Subklonieren bzw. die Deletion kleinerer cDNA-Fragmente erhalten werden konnten (Abb.7).

HITI-cDNA-Spezies der Gruppe HITI-1 (HITI-1.2; 1.0kbp):



HITI-cDNA-Spezies der Gruppe HITI-2 (HITI-2.1; 2.3kbp):



HITI-cDNA-Spezies der Gruppe HITI-3 (HITI-3.1; 1.4kbp):



Abb.7: Restriktionskarten der HITI-cDNA Klone HITI-1.2, HITI-2.1 und HITI-3.1. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind maßstabsgerecht eingetragen (— = 100Bp).

Durch Restriktionsanalyse weiterer Plasmidklone jeder Gruppe war es möglich, auch solche mit jeweils entgegengesetzter Orientierung der cDNA im Vektor nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Um sicher zu gehen, daß die Insertionen der klonierten Phagen keine internen EcoRI Schnittstellen besitzen, wurde die Phagen-DNA der in Abb.7 dargestellten Klone auch mit den Restriktionsendonukleasen Asp718 und PvuII (keines der cDNA-Fragmente zeigte solche Spaltstellen bei der Restriktionsanalyse) verdaut und die Spaltprodukte durch Gelelektrophorese analysiert. Es konnten nur solche Restriktionsfragmente detektiert werden, die unter der Annahme, daß nur die bislang charakterisierten cDNA-Fragmente in der Phagen-DNA inseriert wären, zu erwarten waren (Daten nicht gezeigt).

V-2.2 Sequenzanalyse

Um die vollständige Sequenz der drei cDNA-Insertionen zu bestimmen, wurden zum einen kleinere Restriktionsfragmente aus Plasmidklonen deletiert, in welchen die cDNA-Insertion in jeweils entgegengesetzter Orientierung vorlag. Mit entsprechend verdauter Plasmid-DNA wurde E. coli XL1-Blue transformiert. Nach Isolierung der verkürzten Plasmid-DNA und Sequenzierung mit dem T7 Promotor Primer bzw. dem M13 pUC Sequencing Primer konnten so neue Sequenzdaten erhalten werden. Zum anderen erfolgte die gezielte Erzeugung von Deletionen innerhalb der drei subklonierten HIT1-cDNA-Fragmente (auch hier wiederum mit den entsprechenden Plasmidklonen bei der Orientierungen), bei gleichzeitigem Erhalt des T7 Promotors durch den unidirektionalen Abbau der cDNA jeweils vom 5'- und 3'-Ende über deren gesamte Länge durch ExonukleaseIII-Katalyse (siehe Abb.9a-c).

Mit den angewandten Bedingungen (IV-18) wurden Abbauraten von ≈ 150 Nukleotiden pro Minute erreicht (Ein Beispiel zeigt Abb.8.).

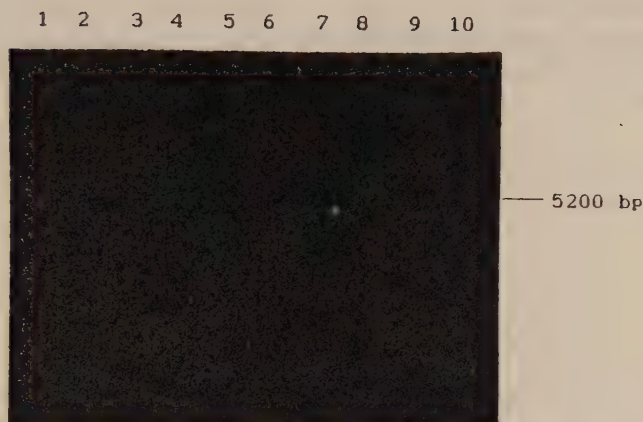


Abb.8: Gelelektrophorese (1%iges Agarosegel) von Plasmid-DNA, die nach Verdau eines HITI-2.1-Plasmidklons (Insertion von 2.3kBp in pTZ19R) mit *SacI* sowie *EcoRV* und Inkubationszeiten (Spuren 1 - 9) von 0 bis 8min (1min-Intervalle) mit ExonukleaseIII schließlich aus *E. coli* DH5-Zellen isoliert werden konnte. In Spur 10 ist das unbehandelte Plasmid aufgetragen.

Die durch Inkubation mit Restriktionsendonukleasen und ExonukleaseIII erzeugten Deletionsplasmide wurden routinemäßig mit dem "T7 Promotor Primer" nach der Methode von Heinrich (1985) sequenziert. Traten Sequenzbereiche auf, welche die DNA-Polymerase in vitro nur fehlerhaft (Banden auf gleicher Höhe bei allen vier Spuren) replizieren konnte, wurden diese durch den Einsatz AMV-reverser Transkriptase lesbar. Im allgemeinen konnten 200-250 Basen pro Sequenzreaktion gelesen werden, wobei diese Werte je nach Qualität der DNA-Präparation nach oben oder unten schwankten (siehe auch Abb.9a-c).

Letzte Unklarheiten in der Gesamtsequenz (fehlende Überlappungen von Teilsequenzen, fehlerhafte Teilsequenzen) wurden durch Sequen-

zieren mit spezifischen Oligonukleotiden beseitigt. Diese wurden nach bereits gesicherten cDNA-Sequenzen, die sich nahe der unsicheren Sequenzen befanden, synthetisiert. In den folgenden Abbildungen (Abb.9a bis Abb.9c) sind die Sequenzierstrategien für die HITI-Plasmidklone HITI-1.2, HITI-2.1 und HITI-3.1 schematisch angegeben.

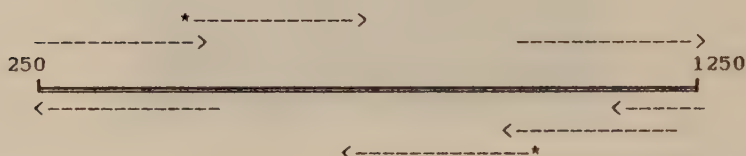


Abb.9a: Die Nukleinsäuresequenz der 1.0 kBp HITI-cDNA-Spezies HITI-1.2 wurde über PstI- und SmaI-Deletionen (siehe Abb.7) sowie durch zwei spezifische Oligonukleotide (*) erhalten. Die Darstellung ist maßstabsgetreu (- = 20Bp). Die Positionsangaben des dargestellten partiellen Klons leiten sich von der vollständigen cDNA-Sequenz des Vorläuferproteins für den Harntrypsininhibitor (Kaumeyer et al., 1986) ab.

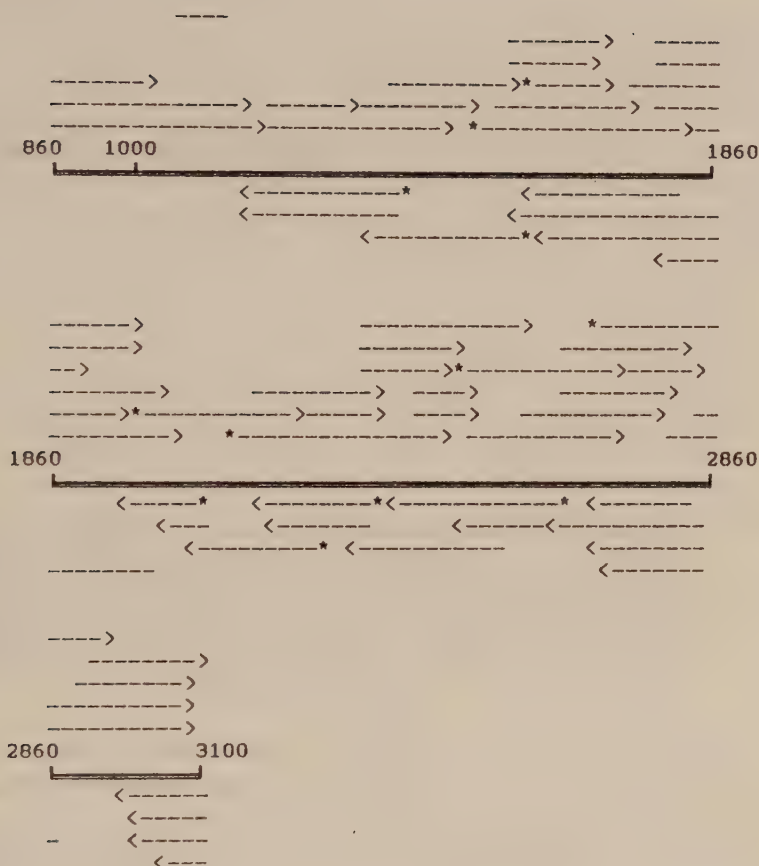


Abb.9b: Die Nukleinsäuresequenz der 2.3 kbp HITI-cDNA-Spezies HITI-2.1 wurde über eine BamHI-Deletion, über ExonukleaseIII-Degradation nach EcoRV/SstI (Polylinker pTZ19R) - bzw. ClaI/SstI (Polylinker pTZ19R) - Verdau (siehe Abb.7) sowie durch spezifische Oligonukleotide (*) erhalten. Die Darstellung ist maßstabsgetreu (- = 20Bp). Die Positionsangaben des dargestellten partiellen Klon leiten sich von der vollständigen cDNA-Sequenz (siehe Abb.17) ab.

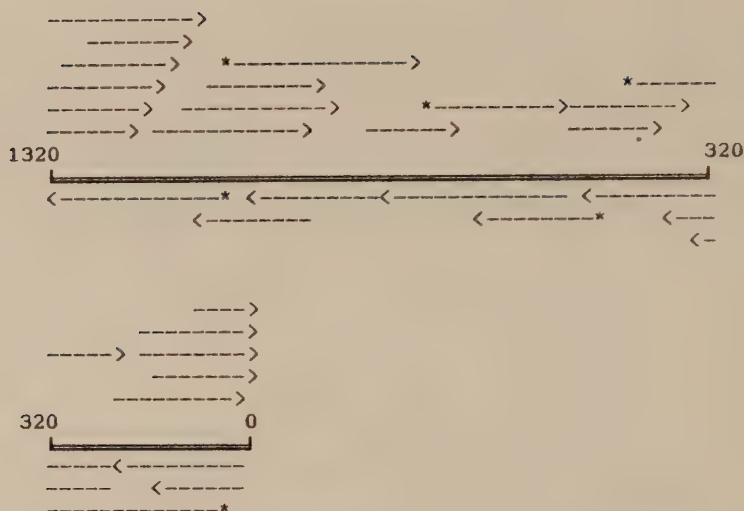


Abb.9c: Die Nukleinsäuresequenz der 1.4 kBp HITI-cDNA-Spezies HITI-3.1 wurde über eine PstI-Deletion, über ExonukleaseIII-Degradation nach SphI/BamHI (beide Polylinker pTZ19R) - Verdau (siehe Abb.7) sowie durch spezifische Oligonukleotide (*) erhalten. Die Darstellung ist maßstabsgetreu (- = 20Bp). Die Positionsangaben des dargestellten partiellen Klangs leiten sich von der vollständigen cDNA-Sequenz (siehe Abb.21) ab.

Ein Vergleich der so erhaltenen cDNA-Sequenzen von HITI-2.1- und HITI-3.1-Plasmidklonen sowie deren abgeleitete Proteinsequenzen mit sämtlichen Daten aus der NBFR-Datenbank und GenBank[®] ergab keinerlei signifikante Übereinstimmungen mit bisher bekannten Protein- oder Nukleinsäuresequenzen. Die cDNA-Sequenz von HITI-1.2-Plasmidklonen deckte sich jedoch völlig mit der kürzlich veröffentlichten Sequenz für das Vorläuferprotein des Harntrypsininhibitors, welches sich aus α -Mikroglobulin (C-terminal) sowie der beiden Kunitztyp-Domänen des HUTI (N-terminal) zusammensetzt (Kau-meyer et al., 1986).

V-2.3 Western-Blot Analyse

Um nachhaltig zu beweisen, daß die cDNA-Sequenzen der Gruppen HITI-2 und HITI-3 ebenfalls für HITI-Proteine kodieren, wurden geeignete Plasmidklone dieser beiden Gruppen in *E. coli* XL1-Blue durch IPTG-induziert und die Zellysate im Western-Blot analysiert. Als Vergleich diente hierbei ein modifizierter Plasmidklon der Gruppe HITI-1, der nur für die beiden Kunitztyp-Domänen des HITI kodiert. Die Konstruktion dieses verkürzten HITI-1.2-Plasmidklons erfolgte über die Isolation des 3'-Sau3a/EcoRI-Fragments [560Bp] (siehe Abb.7) eines HITI-1.2-Plasmidklons [Kunitz-Typ Domänen] aus einem 5%igen Polyacrylamidgel. Anschließend wurde dieses zunächst mit *E. coli* DNA-Polymerase [Klenow-Fragment] in Gegenwart von dGTP und dATP behandelt, dann mit Mung Bean-Nuklease inkubiert und in das Plasmid pTZ19R, das mit HindIII gepalten und mit Mung Bean-Nuklease behandelt worden war, ligiert (siehe Abb.2). Die so gewonnenen rekombinanten Vektoren kodieren für Fusionsproteine, bei denen der N-terminale β -Galaktosidase-Anteil lediglich 12 Aminosäuren beträgt.

Wie in der Abb.10 deutlich zu sehen ist, reagieren die Expressionsprodukte aller drei Gruppen von cDNA-Klonen mit dem HITI-Antiserum.

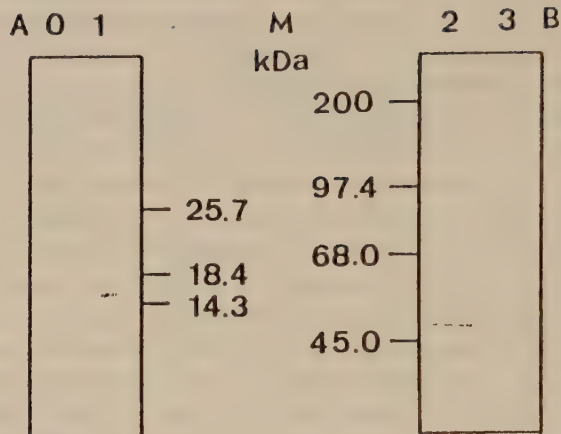


Abb.10: Western-Blots von β -Galactosidase-HITI-Fusionsproteinen der HITI-cDNA-Gruppen HITI-1, -2 und -3. Pro Spur wurden jeweils 20 μ l des Zelllysats auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

A) (15%-Gel): Spur 0: pTZ19R; Spur 1: Verkürzter HITI-1.2 Plasmidklon (560Bp cDNA-Insertion). B) (7.5%-Gel): Spur 2: Plasmidklon HITI-2.1 (2.3kbp cDNA-Insertion). Spur 3: Plasmidklon HITI-3.1 (1.4kbp cDNA-Insertion).

V-2.4 Vorläufige Analyse der cDNA-Sequenzdaten von HITI-1.2, HITI-2.1 und HITI-3.1

Es ergaben sich bei allen drei HITI-cDNA-Gruppen in jeweils einem Leseraster Übereinstimmungen mit Proteinsequenzen von Peptiden, die nach Spaltung nativen HITIs mit Trypsin, Chymotrypsin, Staphylococcus aureus V8 proteinase oder Bromcyan erhalten wurden (die Proteinsequenzen wurden von Herrn Prof. K. Hochstraßer, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der Universität München, Marchioninistr. 15, D-8000 München 70 zur Verfügung gestellt). Hierdurch konnte endgültig gezeigt werden, daß alle drei Gruppen von HITI-cDNA-Sequenzen für HITI-Proteine kodieren.

ren. Die weitere Analyse der Sequenzen belegte auch die Unvollständigkeit aller cDNA-Fragmente im 5'-kodierenden Bereich, da bei keinem die Sequenz eines Signalpeptids – dies ist bei einem sekretorischen Protein zu erwarten – vorhanden war.

Beim Matrix-Vergleich (Abb.11) zeigten die cDNA-Sequenzen der Gruppen HITI-2 und HITI-3 durchgehend deutliche Ähnlichkeiten.

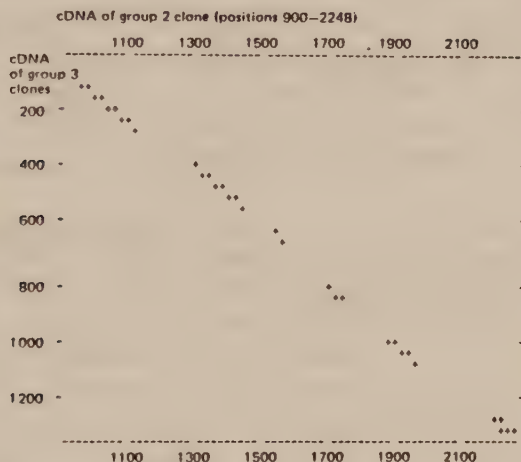


Abb.11: Matrixvergleich der cDNA-Sequenzen der Gruppen HITI-2 und -3 Plasmidklone. cDNA-Segmente, deren Sequenz in 30 von 50 Positionen übereinstimmen sind durch ein (+) gekennzeichnet. Die Abbildung ist der Publikation Schreitmüller et al., 1987 entnommen.

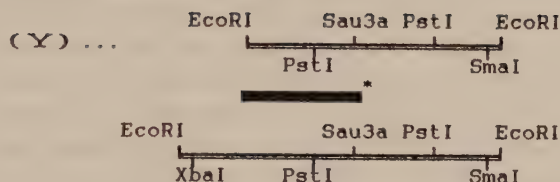
Das Signal für den Translationsstop liegt bei der cDNA-Spezies HITI-2.1 ≈ 800 Bp vom 3'-Terminus entfernt, bei der cDNA-Spezies HITI-3.1 beträgt der Abstand jedoch nur ≈ 200 Bp, was auch durch die bekannten 3'-terminalen Sequenzen der drei weiteren Klone dieser Gruppe (HITI-3.2 bis HITI-3.4) bestätigt werden konnte. Da dieser Sequenzbereich, durch häufig hier auftretende Banden-Kompressionen in den Sequenzgelen bei HITI-2.1 nicht eindeutig zu analysieren

war, wurden fünf weitere cDNA-Klone der Gruppe HITI-2, die nach erneutem Sichten der Genbank mit einem 5'-terminalen EcoRI/ClaI-Restriktionsfragment (siehe Abb.12) von HITI-2.1 erhalten worden waren (siehe V-5), mit einem spezifischen Oligonukleotid, das nahe des Translationsstops hybridisiert, sequenziert. Hierbei zeigte sich, daß bei allen weiteren Vertretern der Gruppe HITI-2 66Bp stromaufwärts des vermeintlichen Stop-Signals ein T insertiert ist. Der dadurch entstandene Wechsel im Leseraster verschiebt das Signal für den Translationsstop 600Bp stromabwärts (siehe auch Abb.17). Vermutlich kommt der Deletion eines T beim cDNA-Fragment HITI-2.1 keinerlei biologische Bedeutung zu. Sie könnte bei der reversen Transkription der mRNA, bei der Replikation der Phagen oder des Plasmids entstanden sein.

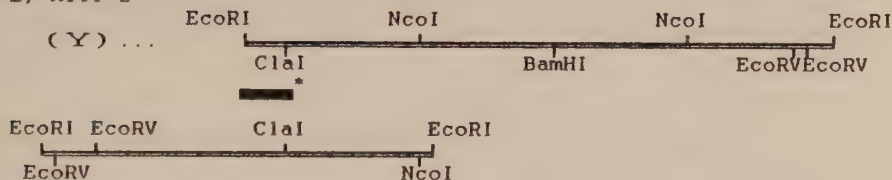
V-3 Vervollständigung der Sequenzdaten der für die drei HITI-Proteine kodierenden cDNAs HITI-1, HITI-2 und HITI-3

Um die vollständigen cDNA-Spezies jeder Gruppe zu erhalten, wurden nach Verdau der Plasmidklone HITI-1.2, HITI-2.1 und HITI-3.1 mit jeweils zwei Restriktionsendonukleasen, Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Elektroelution, 5'-gelegene cDNA-Restriktionsfragmente isoliert. Mit diesen wurde die schon zweimal verwendete Lambda-gt11-Genbank durch Nukleinsäurehybridisierung weiter gesichtet. In der folgenden, zusammenfassenden Darstellung (Abb.12) ist diese Vorgehensweise für alle drei HITI-cDNA-Klone schematisch dargestellt.

A) HITI-1



B) HITI-2



C) HITI-3

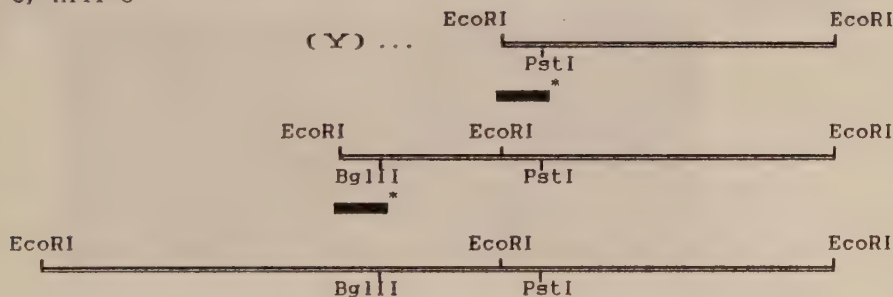


Abb.12: Die mit (Y) ... markierten cDNA-Fragmente wurden über die Detektion ihrer Expressionsprodukte mit anti-HITI-Antiserum kloniert. —*— steht für die DNA-Sonden, mit deren Hilfe die darunter dargestellten, die bereits bekannte Nukleinsäuresequenz fortsetzenden, cDNA-Fragmente der jeweiligen Gruppen kloniert werden konnten. Angegeben sind hier jedoch nur solche HITI-cDNA-Fragmente, deren vollständige Nukleinsäuresequenz bestimmt wurde. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind maßstabsgerecht eingetragen (— = 100bp). A) Klonierte HITI-cDNA-Spezies der Gruppe 1: (HITI-1.2 und HITI-1.2.2 [siehe V-4]). B) Klonierte HITI-cDNA-Spezies der Gruppe 2: (HITI-2.1. und HITI-2.1.3 [siehe V-5]). C) Klonierte HITI-cDNA-Spezies der Gruppe 3 (HITI-3.1, HITI-3.1.5 und HITI-3.1.5.9 [siehe V-6]).

V-4 Vervollständigung der Sequenzdaten der für das HUTI-Protein-1 kodierenden cDNA HUTI-1

Für die cDNA der Gruppe 1 erfolgte das Sichten der Genbank mit einem 5'-terminalen Sau3a/EcoRI-Fragment [≈410bp] (siehe auch Abb.12: A). Hiermit wurden 16 Phagenklone isoliert, deren DNA nach Transfer auf Nitrocellulose mit einem Oligonukleotid aus dem für das Signalpeptid des HUTI-Vorläuferproteins kodierenden Bereich hybridisierte. Wie in der folgenden Abbildung zu sehen ist, zeigten 4 (2, 8, 9, 16) der 16 Klone deutliche Signale.

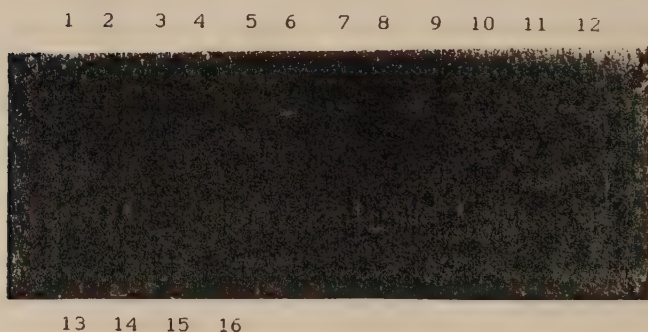


Abb.13: "Slot-Blot" von 16 Gruppe-1-Phagenklonen. Hybridisiert wurde mit der Sonde: 3'-CGACTCGCGGACGGACCGCCACTC-5'

Die cDNA-Insertionen der positiven Phagenklone wurden in den Plasmid-Vektor pT3T719R durch Koloniehybridisierung ampicillin-resistenter E. coli DH5-Transformanten mit dem oben beschriebenen Oligonukleotid (siehe Abb.13) subkloniert und vom 3'- und 5'-Ende her ansequenziert.

V-4.1 Die vollständige cDNA- und davon abgeleitete Proteinsequenz für das HITI-Protein-1

Aus den Sequenzdaten von HITI-1.2 (siehe Abb.9a) und HITI-1.2.2 konnte die Sequenz der ersten, vollständigen, 1228Bp großen HITI-cDNA [HITI-1] (siehe Abb.14) festgelegt werden (Gebhard et al., 1988). Diese ist im 5'-untranslatierten Bereich 15bp (GGCTCTTCTC-GTTGC) länger als die bisher für HUTI beschriebene (Kaumeyer et al., 1986), ansonsten jedoch mit dieser identisch. In der folgenden Abbildung ist die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz der Vorläuferform des HUTI bzw. des HITI-Protein-1 schematisch dargestellt.

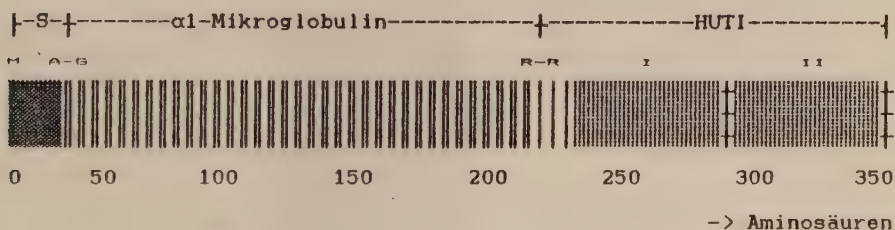


Abb.14: Schematische Darstellung des α_1 -Mikroglobulin-HUTI-Proteins (Kaumeyer et al., 1986). Das aus dem offenen Leseraster (1055Bp) der Klone HITI-1.2 und HITI-1.2.2 abgeleitete Protein beginnt mit einer Signalsequenz (S) von 19 Aminosäuren, die vermutlich nach Ala-Gly (Pos.19) vom Prä-Pro-Protein abgetrennt wird. Das Paar der basischen Aminosäuren Arg-Arg ist die zweite proteolytische Prozessierungsstelle im Protein. Sie liegt genau zwischen dem α_1 -Mikroglobulin-Anteil und der HUTI-Region. Diese ist auch Teil des maturen HITI und beginnt mit einer Sequenz von 21 Aminosäuren, die im nativen Protein in Pos.10 (hier Pos.220 [Ser]) glykosyliert ist. Mit Pos. 231 beginnt schließlich die erste der beiden tandemartig angeordneten Inhibitor-Domänen vom Kunitz-Typ.

V-5 Vervollständigung der Sequenzdaten der für das HITI-Protein-2 kodierenden cDNA HITI-2

Ein mit der bisher untersuchten cDNA HITI-2.1 überlappendes cDNA-Fragment (HITI-2.1.3), das die Sequenz des 5'-Bereichs fort-

setzen sollte, konnte durch Sichten der Genbank mit einem *Cla*I/*Eco*RI-Restriktionsfragment [≈ 150 Bp] (siehe auch Abb.12: B) der unvollständigen cDNA dieser Gruppe erhalten werden. In der folgenden Abbildung (Abb.15) ist das Agarosegel eines *Eco*RI-Verdau zweier Phagenklone, die dieses Fragment enthielten (3 und 4), zu sehen.

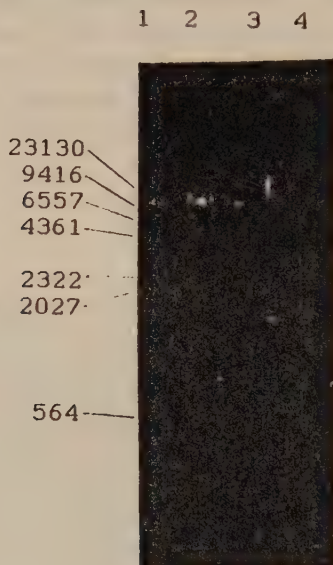


Abb.15: Gelelektrophorese (1%iges Agarosegel) der Lambda-DNA zweier Klone, die überlappend für die cDNA HITI-2 kodieren, nach *Eco*RI-Verdau. Spur 1: Größenmarker "Lambda HindIII Digest™", Spur 2: HITI-2.1 ebenfalls nach *Eco*RI-Verdau, Spur 3 und 4: HITI-2.1.3 und HITI-2.1.4, zwei identische Klone die den fehlenden 5'-terminalen Bereich des cDNA-Fragments HITI-2.1 vervollständigenden.

Das neue cDNA-Fragment wurde in pTZ19R durch Koloniehybridisierung ampicillinresistenter *E. coli* DH5-Transformanten mit einem Oligonukleotid, dessen Sequenz aus dem *Cla*I/*Eco*RI-Restriktionsfragment abgeleitet worden war, subkloniert. Nach der Restriktionsanalyse, und anschließendem Sequenzieren von Strang und Gegenstrang (siehe Abb.16) konnte, zusammen mit den Sequenzdaten des

3'-Bereichs (siehe Abb.9b) die Sequenz der zweiten, vollständigen, 3089Bp großen HIT1-cDNA [HIT1-2] (siehe Abb.17) festgelegt werden (Gebhard et al., 1988).

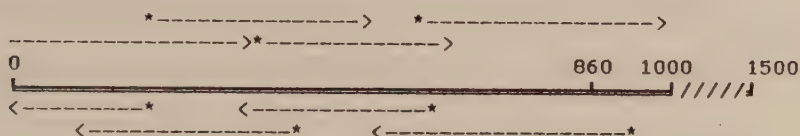


Abb.16: Schematische Darstellung der Nukleinsäuresequenzen (Sequenzierschema) der cDNA-Spezies HIT1-2.1.2. Die Darstellung ist maßstabsgetreu (- = 20Bp). Sequenzen, die mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden erhalten wurden, sind mit (*) gekennzeichnet. Zu HIT1-2.1 überlappende Sequenzbereiche (siehe Abb.9) sind durch (/) gekennzeichnet. Die Positionsangaben entsprechen denen der Abb.17.

V-5.1 Die vollständige cDNA- und davon abgeleitete Proteinsequenz für das HIT1-Protein-2

Abb.17: Vollständige Nukleinsäuresequenz der HIT1-2-cDNA und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des Prä-Pro-Proteins dieser zweiten HIT1-Komponente. Proteinsequenzen, die mit Peptidsequenzen nativen HIT1s übereinstimmen, sind unterstrichen und in Klammern gesetzt (<>). Die mit einem Stern (*) markierte Stelle (Pos.670) steht für die Deletion eines T in einem der sequenzierten Klone (s.o.). Die abgeleitete Proteinsequenz des dadurch entstehenden, alternativen Leserasters wird in der Zeile darunter gezeigt. N+ (Pos.42, 64 und 617) bedeutet Asparagin-N-acetylgalactosamin. 4-Carboxyglutaminsäure-Reste (Pos.228 und 229) sind fett unterstrichen. Die postulierten Spaltstellen für das Signalpeptid und das Pro-Peptid sowie mögliche Stellen der C-terminalen proteolytischen Prozessierung sind durch Dreiecke gekennzeichnet (s.a. Diskussion). Die Abbildung ist der Publikation Gebhard et al. (1988) entnommen.

100 100
 -54 M K R L T C F F I C F F -43
 200 200
 -9
 300 300
 25
 -1 +1
 400 400
 58
 500 500
 92
 600 600
 125
 700 700
 158
 800 800
 192
 900 900
 225
 1000 1000
 258
 1100 1100
 292
 1200 1200
 325
 1300 1300
 358
 1400 1400
 392
 1500 1500
 425
 1600 1600
 458

Ein Vergleich der vollständigen cDNA-Sequenz sowie der davon abgeleiteten Proteinsequenz mit solchen aus zur Verfügung stehenden Datenbanken zeigte keine signifikanten Übereinstimmungen mit bekannten Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen.

Besondere Charakteristika der cDNA HITI-2 sind, neben dem 3'-terminalen poly(dA)-Schwanz und dem 13Bp stromaufwärts davon lokalisierten, klassischen Polyadenylierungssignal (AATAAA), zwei identische, direkt hintereinander liegende Bereiche der Sequenz 5'-TAATTAAAATGAACCAGATATCAGGGTGGT-3' (Pos.2983-3013 und Pos.3014-3044), die ein potentielles Polyadenylierungssignal enthält.

Innerhalb der kodierenden Region (Pos.2259-2280) existiert noch ein weiterer Bereich ähnlicher Sequenz (16 Pos. von 21 sind identisch). Das Signal für den Translationsstop (Pos.2902) schließt ein offenes Leseraster von 2838Bp ab, das für ein Protein mit dem berechneten Molekulargewicht 106447 kodiert.

Die Proteinsequenz enthält drei potentielle Glykosylierungssignale [N-X-T/S] (Pos.42, 64 und 617), jedoch nur zwei dieser Asparaginreste (Pos.64 und 617) konnten als N-Acetylgalactosamin-Derivate identifiziert werden (K.Hochstraßer, persönliche Mitteilung).

V-6 Vervollständigung der Sequenzdaten der für das HITI-Protein-3 kodierenden cDNA HITI-3

Um auch eine vollständige cDNA HITI-3 zu erhalten, wurde die Lambda-gt11 Genbank mit einem 5'-terminalen PstI/EcoRI-Fragment [≈180Bp] (siehe Abb.12; C) der unvollständigen cDNA HITI-3.1 gesichtet.

Wie in der folgenden Abbildung (Abb.18) zu sehen ist, konnten 14 weitere Klone erhalten werden, von denen einige eine zusätzliche EcoRI-Schnittstelle besitzen.

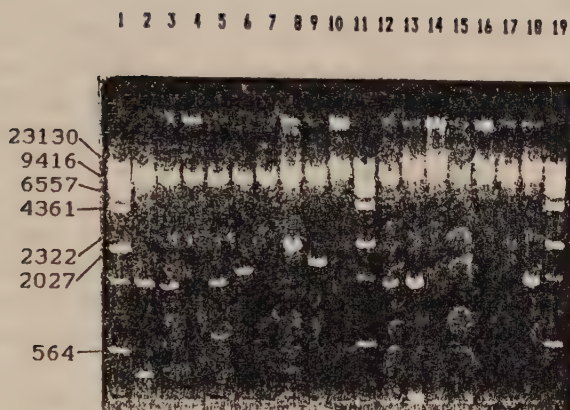


Abb.18: Gelelektrophorese (1%iges Agarosegel) von Lambda-klonen der Gruppe HITI-3 nach EcoRI-Verdau. In der 1., 11. und 19. Spur ist als Größenmarker "Lambda HindIII Digest™" aufgetragen. In Spur 18 ist der EcoRI-Verdau der Phagen-DNA von HITI-3.1 zu sehen (siehe Abb.12: C). In Spur 5 ist die Phagen-DNA von Klon HITI-3.1.5, der die 5'-terminale Fortsetzung von HITI-3.1 enthält aufgetragen.

Nach dem Subklonieren der beiden EcoRI cDNA-Fragmente (1300Bp und 600Bp) aus dem Lambdaklon HITI-3.1.5 in pTZ19R konnten jeweils 5'- und 3'-terminale Sequenzdaten erhalten werden, die folgende Aussagen erlaubten:

1. Die 5'-terminale EcoRI-Schnittstelle von HITI-3.1 ist nicht bei der Konstruktion der Genbank durch Linker-Addition entstanden, sondern ist Teil der cDNA HITI-3, da die Sequenzen stromabwärts der Schnittstelle bei beiden 1.3kBp großen cDNA-Molekülen identisch sind. Darüber hinaus verbindet die Sequenz eines HITI-Peptids (K. Hochstraßer, persönliche Mitteilung) die Leseraster der 1.3kBp und 0.6kBp cDNA-Moleküle von HITI-3.1.5 überlappend.

2. Das 600Bp große Fragment am 5'-Ende von HITI-3.1.5 ist Teil der cDNA HITI-3, da dem durchgehenden Leseraster wiederum Peptidsequenzen von HITI zugeordnet werden können.

3. Die klonierte cDNA HITI-3.1.5 ist vermutlich noch nicht vollständig, da die Sequenz eines HITI-Peptids mit der vom 5'-Ende des 600Bp großen EcoRI-Fragments abgeleiteten Proteinsequenz identisch ist und keine Aminosäurenfolge, die einem Signalpeptid entsprechen könnte, gefunden werden kann.

Daraufhin wurde die Lambda-gt11-Genbank mit einem 5'-terminalen BglII/EcoRI-Restriktionsfragment [≈ 220 Bp] (siehe Abb.12; C), der 600Bp großen Fortsetzung von HITI-3.1 aus HITI-3.1.5.9, durch Nukleinsäurehybridisierung gesichtet, worauf 7 weitere cDNA-Fragmente kloniert werden konnten. In der folgenden Abbildung ist der EcoRI-Verdau dieser Phagenklone nach der Gelelektrophorese zu sehen.

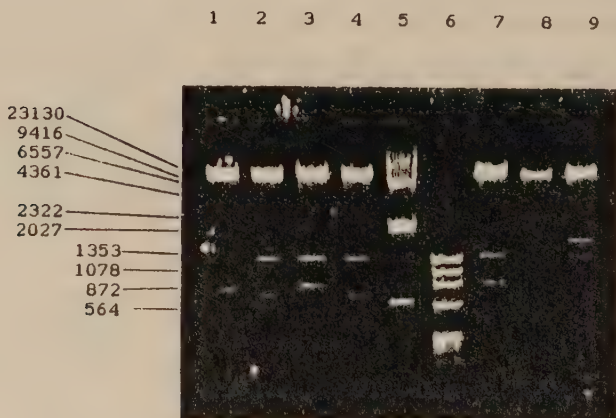


Abb.19: Gelelektrophorese (1% Agarosegel) der dritten Generation von Lambdaklonen der Gruppe HITI-3 nach EcoRI-Verdau. In der 5. Spur ist als Größenmarker "Lambda HindIII Digest", in der 6. "ØX174 RF-DNA/HaeIII" aufgetragen. In Spur 9 die PhagenDNA von Klon HITI-3.1.5.9, der die 5'-terminale Fortsetzung von HITI-3.1.5 enthält aufgetragen.

Wie in Abb.19 zu sehen ist, konnte mit HITI-3.1.5.9 ein Phagen-Klon erhalten werden, dessen cDNA-Insertion ($\approx 3\text{kBp}$) größer ist als die bis dahin bekannte. Daß es sich hierbei ebenfalls um eine cDNA der Gruppe 3 handelt, zeigte bereits das Vorhandensein des 1.3kBp großen EcoRI-Fragments, das auch bei allen anderen Klonen dieser Gruppe detektiert werden konnte und HITI-3.1 entspricht (siehe auch Abb.12: C).

Die beiden EcoRI-cDNA-Fragmente von HITI-3.1.5.9 (1.3KBp und 1.7KBp) aus dem Lambdaklon wurden in pTZ19R subkloniert und jeweils 5'- und 3'-terminal ansequenziert. Dabei ergab sich, daß die 3'-terminalen Sequenzdaten des 1.7kbp-Fragments identisch sind mit denen des bereits sequenzierten 600Bp-Fragments und daß dieser Klon die bereits bekannte Sequenz von HITI-3.1.5 5'-terminal fortsetzt.

Deshalb wurde das 1.7kbp große cDNA-Fragment durch Erzeugen von ExonukleaseIII-Deletionsmutanten aus zwei Plasmidklonen mit cDNA-Insertion jeweils entgegengesetzter Orientierung, sowohl in 3',5'-Richtung als auch in 5',3'-Richtung und mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide sequenziert (siehe Sequenzierschema Abb.20).

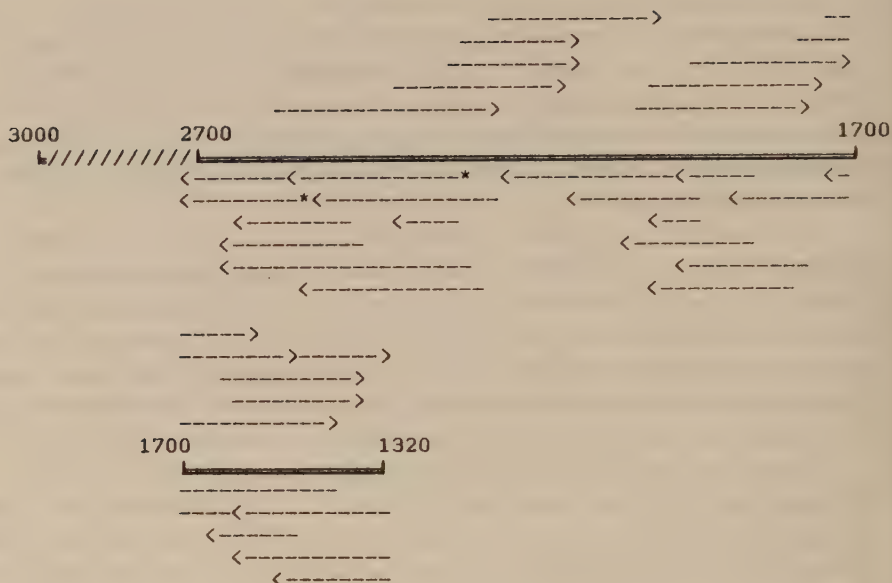


Abb.20: Schematische Darstellung der Nukleinsäuresequenz (Sequenzierschema) des 1.7 kbp Teils von HITI-3.1.5.9 (siehe auch Abb.12; C). Die Darstellung ist maßstabsgetreu (- = 20Bp). Sequenzen, die mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden erhalten wurden, sind mit einem (*) gekennzeichnet. Die Sequenzbereiche, die für das fettsäurebindende Protein (siehe unten) kodieren sind durch (/) gekennzeichnet. Die Positionsangaben entsprechen denen der Abb.21.

Nach Analyse der Sequenzdaten konnte gezeigt werden, daß nur die 3'-terminalen 1378Bp des 1.7kbp cDNA-Fragments von HITI-3.1.5.9 für das von einer vollständigen HITI-3-cDNA abzuleitende Protein kodieren. Die Sequenz der verbleibenden 5'-terminalen ~300Bp des 1.7 kbp cDNA-Fragments zeigt die Charakteristika einer unabhängigen mRNA. 3'-terminal befindet sich ein poly(dA)-Schwanz und 13Bp stromaufwärts davon ist ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) lokalisiert.

Beim Vergleich dieses 5'-terminalen Sequenzabschnitts mit den Sequenzen der Nukleinsäure- und Protein-Datenbanken ergab sich

Übereinstimmung mit der cDNA-Sequenz des fettsäurebindenden Proteins (FABP). Vermutlich erfolgte bei der Konstruktion der Genbank eine artifizielle Ligierung der beiden unabhängigen cDNA-Fragmente. Nach Abzug der für das FABP-ähnliche Protein kodierenden Sequenz verbleiben $\approx 2.7\text{kBp}$ für eine HITI cDNA-Spezies der Gruppe 3 (HITI-3).

Daß das hier analysierte cDNA-Fragment noch nicht für das vollständige Protein dieser Gruppe kodiert, wird durch die Sequenz eines HITI-Peptids belegt (K. Hochstraßer, persönliche Mitteilung). Sie überlappt mit der N-terminalen Sequenz der soweit abgeleiteten Primärstruktur des HITI-Protein-3. Darüber hinaus kann auch keine Aminosäurenfolge, die einem Signalpeptid entsprechen könnte, in diesem Bereich gefunden werden.

Es scheint unwahrscheinlich, einen Klon einer vollständigen cDNA HITI-3 in der verwendeten Genbank zu finden, da beim letzten Experiment $2.5 \cdot 10^5$ rekombinante Klone gesichtet wurden und nach Clarke und Carbon (1976) das Sichten von $1.52 \cdot 10^5$ solcher Klone ausreichend sein sollte, um eine bestimmte cDNA-Spezies mit 99% Wahrscheinlichkeit zu finden. Auch die Wahrscheinlichkeit, ein mit dem 5'-Terminus von HITI-3.1.5.9, überlappendes Bruchstück zu detektieren, muß nach bereits dreimaligem Sichten der Genbank als gering veranschlagt werden. Durch cDNA-Klonierung des 5'-Bereichs der mRNA-Population der Gruppe 3 über die Extension eines spezifischen Oligonukleotids, dessen Sequenz aus den bisher bekannten 5'-terminalen Daten von HITI-3.1.5.9 entnommen werden müßte, mit Reverser Transkriptase, sollte die Sequenz der HITI-3-cDNA vervollständigt werden können. Im folgenden werden die Charakteristika der fast vollständigen cDNA HITI-3 sowie der davon abgeleiteten Proteinsequenz dargestellt (Abb.21).

V-6.1 Die partielle cDNA- und davon abgeleitete Proteinsequenz für das HITI-Protein-3

AGTGGTCAACACTGCCAATGAAGCCAGGGAAGTGGCCTTCGACCTGGAAATCCCCAAGAC	60
<u>< V V N T A N E A R E V A F D L E I P K T</u>	20
AGCATTTCATCAGTGACTTTGCCGTTACAGCAGATGGAAACGCATTTATCGGAGACATAAA	120
<u>A F I S D F A V T A D G N A F I G D I K</u>	40
GGACAAGGTGACTGCATGGAAGCAGTACCGGAAAGCAGCTATCTCAGGAGAGAATGCCGG	180
<u>D K V T A W K Q Y R K A A I S G E N A G</u>	60
CCTTGTGAGGGCCTCGGGGAGAACTATGGAGCAATTCACCATCCACCTCACCCTCAATCC	240
<u>L V R A S G R T M E Q F T I H L T V N P</u>	80
CCAGAGCAAGGTACGTTTCAGCTGACTTATGAGGAAGTGCTGAAGAGAAACCATATGCA	300
<u>Q S K V T F Q L T Y E E V L K R N H M Q</u>	100
GTATGAAATTGTCATCAAAGTCAAGCCCAAGCAGCTGGTGCATCATTTTGAGATTGATGT	360
<u>Y E I V I K V K P K Q L V H H F E I D V</u>	120
GGACATCTTCGAGCCCCAGGGGATCAGCAAGCTGGATGCCAGGCCCTCTTCTGCGGAA	420
<u>D I F E P Q G I S K L D A Q A S F L P K</u>	140
GGAAGTGGCAGCCCAACTATCAAGAAGTCCTTCTCAGGAAAAAAGGGTCATGTGCTGTT	480
<u>E L A A Q T I K K S F S G K K G H V L F</u>	160
CCGTCCACCGTGAGCCAGCAGCAGTCTGCCCCACATGCTCTACATCCTTACTGAACGG	540
<u>R P T V S Q Q Q S C P T C S T S L L N G</u>	180
GCATTCGAAGGTGACCTACGATGTCAGTCGAGACAAGATCTGCGACCTCCTGGTGGCCAA	600
<u>H F K V T Y D V S R D K I C D L L V A N</u>	200
TAACCACTTTGCCACTTCTTTGCCCCCCAAAACCTGACAAACATGAACAAGAAGCTGGT	660
<u>N H F A H F F A P Q N L T N M N K N V V</u>	220
TTTTGTGATTGACATCAGTGGCTCCATGAGAGGCCAGAAAGTGAAGCAGACCAAGGAGGC	720
<u>F V I D I S G S M R G Q K V K Q T K E A</u>	240
ACTCCTTAAAATTCTGGGGGACATGCAGCCAGGGGACTACTTTGACCTGGTTCTTTTGG	780
<u>L L K I L G D M Q P G D Y F D L V L F G</u>	260
GACTCGAGTACAATCGTGAAGGGCTCGCTGGTGCAAGCATCTGAGGCCAACCTACAAGC	840
<u>T R V Q S W K G S L V Q A S E A N L Q A</u>	280
AGCTCAAGACTTTGTGCGGGGCTTTTCCCTGGATGAGGCCACAAACCTGAATGGAGGTTT	900
<u>A Q D F V R G F S L D E A T N L N G G L</u>	300
GCTCCGGGGAATTGAGATCTTGAACCAAGTTTCAGGAAAGCCTCCAGAACTCAGCAACCA	960
<u>L R G I E I L N Q V Q E S L P E L S N H</u>	320
TGCCTCAATACTCATCATGTTGACAGATGGCGATCCACAGAGGGGGTGACGGACCGTTC	1020
<u>A S I L I M L T D G D P T E G V T D R S</u>	340
CCAAATCCTCAAGAACGTCCGCAACGCCATCCGGGGCAGGTTCCCGCTCTACAACTGGG	1080
<u>Q I L K N V R N A I R G R F P L Y N L G</u>	360

TTTCGGCCACAATGTGGACTTTAACTTTCTGGAGGTCATGTCCATGGAGAACAACGGAGC 1140
F G H N V D F N F L E V M S M E N N G R 380
 GGCCAGAGAATCTACGAGGACCATGATGCCACCCAGCAGCTGCAGGGTTTCTACAGCCA 1200
A Q R I Y E D H D A T Q Q L Q G F Y S Q 400
 GGTAGCCAAACCCCTGCTGGTGGATGTGGATTTGCAGTACCCCCAGGATGCTGTCTTGGC 1260
V A K P L L V D V D L Q Y P Q D A V L A 420
 CCTGACCCAGAACCACCATAAACAGTACTACGAAGGCTCAGAGATTGTGGTGGCCGGGCG 1320
L T Q N H H K Q Y Y E G S E I V V A G R 440
 CATTGCTGACAACAACAGAGCAGCTTCAAGGCTGATGTGCAGGCCCATGGGGAGGGACA 1380
I A D N K Q S S F K A D V Q A H G E G Q 460
 AGAATTCAGTATAACCTGCCTAGTGGATGAGGAGGAGATGAAGAACTGCTCCGAGAGCG 1440
E F S I T C L V D E E E M K K L L R E R 480
 TGGCCACATGCTGGAGAACCACGTCGAGCGCCTCTGGGCCCTACCTCACCATCCAGGAGCT 1500
G H M L E N H V E R L W A Y L T I Q E L 500
 GCTGGCCAAGCGGATGAAGGTGGACAGGGAGGAGAGGGCCAACCTGTCTATCCAGGCCCT 1560
L A K R M K V D R E E R A N L S S Q A L 520
 GCAGATGTCGCTGGACTATGGGTTTGTGACCCCACTGACCTCCATGAGCATCAGGGGCAT 1620
Q M S L D Y G F V T P L T S M S I R G M 540
 GGCGGACCAGGACGGCCTGAAGCCCACCATCGACAAGCCCTCAGAGGATTCTCCGCCCTTT 1680
A D Q D G L K P T I D K P S E D S P P L 560
 GGAGATGCTGGGACCCAGAAGGACGTTCTGTGCTGCAGCCTTGACGCCCTTCTCCTACTCA 1740
E M L G P R R T F V L S A L Q P S P T H 580
 TTCCAGCTCCAATACCCAGCGGCTGCCAGACCGAGTGACCGGCGTGACACAGACCCTCA 1800
S S S N T Q R L P D R V T G V D T D P H 600
 CTTTCATCATCCACGTGCCCCAGAAAGAGGACACCCTGTGCTTCAACATCAATGAGGAGCC 1860
F I I H V P Q K> E D T L C F N I N E E P 620
 TGGTGTATCCCTGAGCCTGTACAGGACCCCAACACAGGCTTCTCAGTGAATGGACAGCT 1920
G V I L S L V Q D P N T G F S V N G Q L 640
 CATTGGCAACAAGGCCAGGAGCCCTGGGCAGCATGACGGCACGTACTTCGGGGCGGTGGG 1980
I G N K A R S P G Q H D G T Y F G R L G 660
 AATCGCAAACCCCTGCCACGGACTTTTCAGTTGGAAGTGACTCCTCAGAACATTACGCTGAA 2040
I A N P A T D F Q L E V T P Q N I T L N 680
 CCCC GGCTTTGGTGGGCCTGTGTTTTCTGGAGGGACCAAGCTGTGCTGCGGCAGGACGG 2100
P G F G G P V F S W R D Q A V L R Q D G 700
 GGTGGTGGTGACCATCAACAAGAAGAGGAACCTGSGGTGTCTGTGGACGACGGTGGCAC 2160
V V V T I N K K R N L V V S V D D G G T 720

```

CTTTGAGGTTGTTTTGCACCGAGTGTGGAAGGGGAGCTCGGTCCACCAGGACTTCCTGGG 2220
F E V V L H R V W K G S S V H Q D F L G 740

CTTCTATGTGCTGGACAGTCATCGGATGTCTAGCCCGGACGCACGGGCTGCTGGGGCAATT 2280
F Y V L D S H R M S A R T H G L L G Q F 760

TTTCCACCCCATCGGTTTTGAAGTGTCTGACATCCACCCAGGCTCTGACCCCAAAAGCC 2340
F H P I G F E V S D I H P G S D P T K P 780

AGATGCCACGATGGTGGTGAGGAACCGCCGGCTCACGGTCACCAGGGGTTTGCAAAAAGA 2400
D A T M V V R N R R L T V T R G L Q K D 800

CTACAGCAAGGACCCGTTGGCATGGGGCCGAGGTGTCTGCTGGTTTCATTCAACAATGG 2460
Y S K D P W H G A E V S C W F I H N N G 820

GGTGGACTCATCGATGGTGCCCTACACTGATTATATCGTCCCGACATCTTCTGAGCCCT 2520
A G L I D G A Y T D Y I V P D I F U 837

CTGGCCAGCACGCCTGTCTCTCCCCGGGGCCAAGGCAGAGGAGGAGGACGACATCCTGAC 2580
CTGCTGCTGAGGCTGTACCTCCTTGACTAAGCTGGTTCCTTGTGTCAAAGCACCTCATGC 2640
CTTCCATTAAAGAGAGGCCGTGTCCpoly(A) 2665

```

Abb.21: Partielle Nukleinsäuresequenz der HITI-3-cDNA und die abgeleitete Aminosäuresequenz des Pro-Proteins der dritten HITI-Komponente. Der mit Peptidsequenzen des nativen HITI übereinstimmende Sequenzbereich ist unterstrichen und in Klammern gesetzt (<>). Die potentielle Stelle der C-terminalen Prozessierung ist durch ein Dreieck gekennzeichnet (siehe auch Diskussion), das Polyadenylierungssignal ist unterstrichen und fett gedruckt.

Auch für die cDNA-Sequenz von HITI-3 und der von ihr abgeleiteten Proteinsequenz lassen sich keine signifikanten Übereinstimmungen mit den Sequenzen der Nukleinsäure- und Protein-Datenbanken erkennen.

Die 2665Bp umfassende cDNA-Sequenz beginnt mit einem 2512Bp langen offenen Leseraster, das von einem Signal für den Translationsstop (Pos. 2515) beendet wird. Weitere 135Bp stromabwärts befindet sich das Polyadenylierungssignal (ATTAAA), das nach weiteren 15Bp von einem poly(dA)-Schwanz gefolgt wird. Das daraus abgeleitete Protein besteht aus 837 Aminosäuren und weist ein berechnetes Molekulargewicht von 93470 auf.

Die Proteinsequenz enthält drei potentielle Glykosylierungssignale [N-X-T/S] in den Pos.211, 514 und 676.

VI. Diskussion

VI-1 Inter- α -trypsininhibitor ist ein Komplex dreier Proteinkomponenten

Frühere Befunde, daß der Inter- α -trypsininhibitor ein einkettiges Protein ist, dessen inhibitorisch wirksamer Teil sich im N-terminalen Bereich der Peptidkette befindet (Übersicht: Gebhard & Hochstraßer, 1986), sind durch die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit eindeutig widerlegt. Es können darüber hinaus die Resultate von Bourguignon et al. (1983) und Kaumeyer et al. (1986) berichtigt, erweitert und neu interpretiert werden. Bourguignon et al. konnten nach Größenfraktionierung von Pavianleber-mRNA zwei mRNA-Populationen nachweisen, deren Translationsprodukte (≈ 40 kDa und ≈ 95 kDa) mit anti-HITI-Antiserum immunopräzipitierbar waren. Nur das 40kDa-Protein konnte mit anti-HUTI-Antiserum gefällt werden. Da jedoch die Zusammensetzung der mRNA-Populationen und die Primärstrukturen der translatierten Proteine unbekannt waren, wurde die Struktur des HITI-Komplexes falsch interpretiert: Er sollte aus zwei identischen "leichten" (dem 40kDa-Protein) und einer "schweren Kette" (dem 95kDa-Protein) bestehen. Die Gruppe um Kaumeyer konnte mit Hilfe von Oligonukleotiden, die sie aus der Proteinsequenz der inhibitorisch aktiven Domänen des Harntrypsininhibitors abgeleitet hatte, lediglich eine cDNA-Spezies klonieren, die für ein 42kDa-Protein kodiert. Dieses Protein enthält neben der Sequenz des reifen HUTI auch die für α -Mikroglobulin (siehe IV-4, Abb.14).

Der sinnvollste Weg zur Aufklärung der HITI-Primärstruktur war deshalb das Klonieren von HITI-cDNA nach Detektion ihrer Expressionsprodukte mit Hilfe immunologischer Methoden. Mit polyklonalen Antikörpern gegen HITI (anti-HITI-Antiserum) sollten cDNA-Expressionsprodukte aller HITI-mRNA-Populationen detektiert werden können. Zusätzliche mRNA-Spezies, die für einkettigen HITI mit N-terminalem Inhibitoranteil kodieren, konnten jedoch weder auf diesem Weg noch auf dem von Kaumeyer et al. (1986) beschriebenen nachgewiesen werden.

VI-2 Die Präpro-Proteine aller drei Komplexkomponenten werden intensiv proteolytisch prozessiert

VI-2.1 Die proteolytische Prozessierung des HITI-Präpro-Protein-1

Die vollständige Sequenz der HITI-cDNA HITI-1 ist mit der HUTI-cDNA-Sequenz identisch. Daraus kann geschlossen werden, daß nur eine mRNA-Population existiert, die sowohl für die Kunitztyp-Domänen des HUTI als auch für die des HITI kodiert. Das primäre Translationsprodukt dieser mRNA wird also unabhängig vom Vorkommen der Kunitztyp-Domänen (als HUTI oder Komponente des HITI-Komplexes) immer gleich prozessiert. Es enthält somit einen Proteinanteil (α_1 -Mikroglobulin), der nicht im reifen HITI erscheint.

Ein zwingender Grund, die Existenz von HUTI in Serum, Harn oder anderen Körperflüssigkeiten ausschließlich aus der Proteolyse einer höhermolekularen HITI-Vorstufe abzuleiten (Hochstraßer et al., 1976), ist somit nicht vorhanden.

VI-2.2 Die proteolytische Prozessierung des HITI-Präpro-Protein-2

Die berechnete Molekülmasse des HITI-Präpro-Proteins der Gruppe 2 (≈ 106 kDa) zeigt gute Übereinstimmung mit dem Translationsprodukt der zweiten mRNA-Population (≈ 95 kDa; Bourguignon et al., 1983). Analog wie bei HITI-Protein-1 erscheint auch hier, nach N- und C-terminaler proteolytischer Prozessierung, nur ein Teil der Sequenz des primären Translationsprodukts (≈ 70 kDa) im reifen HITI.

So wurde der N-terminale Bereich des Proteins, der das potentielle Signalpeptid enthalten könnte, nach den Regeln von Von Heijne (1986) identifiziert. Wie in der folgenden Abbildung (Abb.22) deutlich zu erkennen ist, folgen dem Startkodon Methionin zunächst zwei basische Aminosäuren und dann neun hydrophobe Reste, die vermutlich eine β -Faltblattstruktur ausbilden. Daran schließt sich eine polarere Region von sechs Aminosäuren an, wobei die Signalpeptidase das Peptid vermutlich nach dem Glycinrest (Pos.-37) اسپaltet. An dieser Stelle wird eine β -Schleife vorhergesagt.

Betrachtet man die Verteilung der Peptidsequenzen des nativen HITI im N-terminalen Bereich der abgeleiteten Proteinsequenz (Abb.22 und Abb.17), so ist zwischen der vorhergesagten Spaltstelle für die Signalpeptidase und der ersten Peptidsequenz, die mit

der abgeleiteten Proteinsequenz übereinstimmt, deutlich ein Proteinbereich (Pos.-36 bis Pos.-1) zu erkennen, der nicht mit Peptiden des reifen HITI überlappt. Interessanterweise ist die Peptidsequenz des nativen HITI, die dem N-Terminus der abgeleiteten Proteinsequenz am nächsten liegt, nach einer Bromcyanspaltung erhalten worden. Da der Bereich (Pos.-36 bis Pos.-1) kein weiteres Methionin enthält, müßte es sich demnach um das N-terminale Bromcyanpeptid des reifen Protein-2 handeln. Es ist somit wahrscheinlich, daß es sich bei der Proteinsequenz, die zwischen der Signalsequenz und der des N-terminalen Bromcyanpeptids liegt, um ein Aktivierungspeptid handelt. Dieses sollte von einer trypsinähnlichen Proteinase hinter dem Arginin in Pos.-1 abgespalten werden (siehe Abb.7), da an dieser Stelle auch eine β -Schleife vorhergesagt wird. Für das reife Protein-2 war daher die N-terminale Sequenz S-L-P-G-E-S-E-E-M anzunehmen. Diese Vermutung wurde mittlerweile durch die N-terminale Sequenzierung des nativen HITI von Jessen et al. (1988) bestätigt.

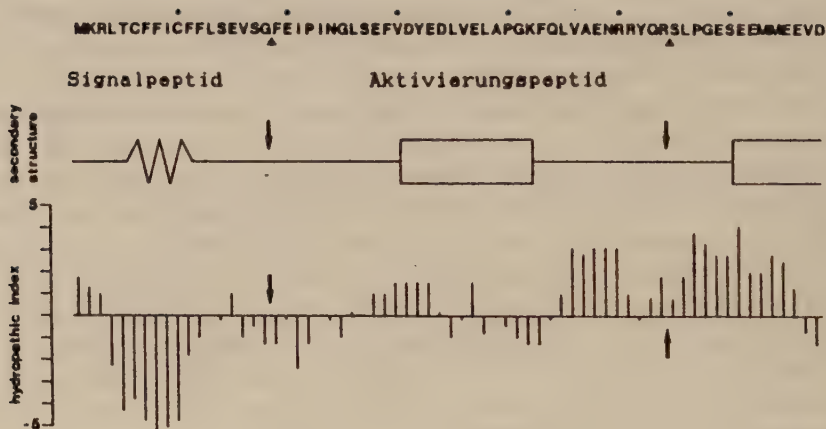


Abb.22:Hypothetisches Signalpeptid, Propeptid und N-terminalen Proteinsequenz des reifen Gruppe 2-Proteins. Darunter sind die vorhergesagten Sekundärstrukturen abgebildet (Garnier et al., 1978) (Kästen, zick-zack Linien, Geraden und Pfeile stehen entsprechend für α -Helices, β -Faltblatt, zufällige Sequenzanordnungen bzw. β -Schleifen). In der dritten Zeile ist schließlich die Hydropathie-Profil des vorhergesagten Proteins graphisch dargestellt (Hopp et al., 1981). Die Abbildung ist der Publikation Gebhard et al. (1988) entnommen.

Ähnliche Überlegungen wurden auch für den C-terminalen Bereich (Pos.645-Pos.892) angestellt. Innerhalb dieses Sequenzbereichs (Abb.17) zeigen sich ebenfalls keine Übereinstimmungen mit Peptidsequenzen des nativen HIT1 gefunden werden. Obwohl keine spezifischen Sequenzdaten für die C-terminalen Teile des muren HIT1 vorliegen, können als potentielle Stellen proteolytischer Prozessierung die Arginylbindung in Pos.644 und die Lysylbindung in Pos.660 postuliert werden. In beiden Fällen wäre, wie auch bei der N-terminalen Prozessierung, eine basische Aminosäure involviert

und das resultierende reife Protein würde vier paarweise angeordnete Cysteinreste enthalten. Auch die bereits oben angesprochene Insertion eines T (siehe V-3.2 und Abb.17) bei einem der sequenzierten cDNA-Klone und der dadurch bedingte Wechsel im Leseraster hätte dann keinen Einfluß auf die Primärstruktur des reifen Proteins.

VI-2.3 Die proteolytische Prozessierung des HITI-Präpro-Protein-3

Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen von HITI-Protein-2 mit HITI-Protein-3 (siehe Abb.23) wird deutlich, daß die Sequenz P-Q-K-E (Pos.606, HITI-Protein-3) nur um eine Position zu der hier vorhandenen Sequenz S-Q-K-N (Pos.658, Protein-2) versetzt auftritt. Auch nach dieser Sequenz kann im Protein-3 weiter C-terminal keine überlappende Peptidsequenz des nativen HITI gefunden werden (siehe Abb.21). Ebenso wie bei dem Protein-2-Vorläufer, würde die Spaltung nach der basischen Aminosäure in Pos.608 zu einem reifen Protein mit vier Cysteinresten führen. Zu letztlich beweisenden Angaben gelangt man jedoch nur über die Isolierung der C-terminalen Peptide des nativen HITI nach Spaltung mit Bromcyan oder einer Protease.

Über die N-terminale Prozessierung des HITI-Protein-3 können wegen der Unvollständigkeit der zugrunde liegenden cDNA-Sequenz so weit keine Angaben gemacht werden, doch sind aufgrund der großen Sequenzähnlichkeiten zu HITI-Protein-2 weitgehende Analogien zu erwarten.

Die mRNA-Population, der das 95kDa-Translationsprodukt zugeordnet wurde (Bourguignon et al. 1983), besteht also in Wirklichkeit aus zwei Transkripten, die für zwei sequenzähnliche Proteine gleicher Größe kodieren. Sämtliche Peptidsequenzen des gereinigten, nativen Proteins finden in den bisher abgeleiteten Proteinsequenzen der Klone der Gruppen 1, 2 und 3 ihre Entsprechung. HITI besteht demnach nur aus den drei Protein-komponenten HITI-Protein-1 (Kunitztyp-Domänen), HITI-Protein-2 und HITI-Protein-3. Ergebnisse von Jessen et al. (1988) unterstützen diese Sicht. Diese Gruppe sequenzierte gereinigten HITI und identifizierte neben der bekannten HI-30 Sequenz die Sequenz S-L-P-G-E-K-E-Q-A-V-D-T. Bei

den Schritten 9-11 konnten sie zusätzliche PTH-Derivate der Aminosäurenfolge M-M-E eindeutig nachweisen. Vergleicht man diese Sequenzen mit der für das reife HITI-Protein-2 abgeleiteten, (siehe Abb.17) so kann man deutlich die Übereinstimmung in den jeweiligen Positionen 1-5, 7 und 9-11 (zusätzliche PTH-Derivate) erkennen. Ohne die Kenntnis der N-terminalen Sequenzen von Protein-2 und -3 war es dieser Gruppe jedoch nicht möglich ihre Sequenzdaten drei verschiedenen Proteinen zuzuordnen. Eine solche Zuordnung könnte aufgrund der Sequenzähnlichkeit von Protein-2 und Protein-3 zusätzlich erschwert sein.

VI-3 Sequenzvergleich der HITI-Proteine 2 und 3

Bei der Sequenzzusammenstellung von HITI-Protein-2 und -3 in Abb.23 beträgt der Anteil identischer Aminosäuren auf ebensolchen Positionen 42% über die Länge der Sequenz von Protein-3. Berücksichtigt man konservative Aminosäurenaustausche, ergibt sich sogar eine Sequenzhomologie von 70%. Die Positionen von vier der sechs Cysteinreste sind konserviert, wovon sich zwei innerhalb des C-terminalen Aktivierungspeptids befinden. Es wäre deshalb nicht erstaunlich, wenn man nach Analyse der genomischen Organisation beider Gene ihr Entstehen auf die Duplikation eines gemeinsamen Vorläufers zurückführen könnte. Die große Ähnlichkeit beider Proteine spricht auch für einen sehr ähnlichen proteolytischen Reifungsprozess. Offensichtlich besteht der HITI-Komplex aus einem Protein mit den beiden Kunitztyp-Domänen [M_r (glykosyliert) ≈ 55000] und den beiden Proteinkomponenten 2 und 3 [M_r (glykosyliert) jeweils ≈ 70000]. Tatsächlich konnten Gebhard et al. (1988) nach Ionenaustausch-Chromatographie von HITI, der durch Ammonsulfatfällung von humanem Serum partiell vorgereinigt war, nach der SDS-Gelelektrophorese im Western-Blot drei immunoreaktive Banden der Massen 85kDa, 78kDa und 56kDa nachweisen. Lediglich das 56kDa-Protein, das vermutlich aus den beiden Kunitztyp-Domänen besteht, zeigt inhibitorische Aktivität. Diese Erkenntnisse sind besonders aus der Sicht der Funktion des HITI-Komplexes von Interesse.

1

MKRLTCFFICFFLSEVSGFEIPINGLSEFVDYEDLVELAPGKFQLV AENRRYQR

55 S L P G E S E E M M E E V D Q V T L Y S Y K V Q S T I T S R M
 86 A T T M I Q S K V V N N S P Q P Q N V V F D V Q I P K G A F I
 1 V V N T A N E A R E V A F D L E I P K T A F I
 117 S N F S M T V D G K T F R S S I K E K T V G R A L Y A Q A R V
 24 S D F A V T A D G N A F I G D I K D K V T A W K Q Y R K A A V
 148 A K G K T A G L V R S S A L D M E N F R T E V N V L P G A K Q
 55 I S G E N A G L V R A S G R T M E Q F T I H L T V N P O S K T
 179 F E L H Y Q E V K W R K L G S Y E H R I Y L Q P G R L A K H L
 86 F Q L T Y E E V L K R N H M Q Y E I V I K V K P K Q L V H H F
 210 E V D V W V I E P Q G L R F L H V P D T F E G H F D G V P V I
 117 E I D V D I F E P Q G I S K L D A Q A S F L P K E L A A Q T I
 241 - S K G Q Q K A H V S F K P T V A Q Q R I C P S C R E T A V
 148 K K S F S G K K G H V L F R P T V S Q Q Q S C P T C S T S L L
 270 D G E L V V L Y D V K R E E K A G E L E V F N G Y F V H F F A
 179 N G H F K V T Y D V S R - D K I C D L L V A N N H F A H F F A
 301 P D N L D P I P K N I L F V I D V S G S M W G V K M K Q T V E
 209 P Q N L T N M N K N V V F V I D I S G S M R G Q K V K Q T K E
 332 A M K T I L D D L R A E D H F S V I D F N Q N I R T W R N D L
 240 A L L K I L G D M Q P G D Y F D L V L F G T R V Q S W K G S L
 363 I S A T K T Q V A D A K R Y I E K I Q P S G G T N I N E A L L
 271 V Q A S E A N L Q A A Q D F V R G F S L D E A T N L N G G L L
 394 R A I F I L N - E A N N L G L L D P N S V S - L I I L V S D G
 302 R G I E I L N Q V Q E S L P E L - S N H A S I L I M L - T D G
 423 D P T V G E L K L S K I Q K N V K E N I Q D N I S L F S L G M
 331 D P T E G V T D R S Q I L K N V R N A I R G R F P L Y N L G F
 454 G F D V D Y D F L K R L S N E N H G I A Q R I Y G N Q D T S S
 362 G H N V D F N F L E V M S M E N N G R A Q R I Y E D H D A T Q
 485 Q L K K F Y N Q V S T P L L R N V Q F N Y P H T S V T D V T Q
 393 Q L Q G F Y S Q V A K P L L V D V D L Q Y P Q D A V L A L T Q
 516 N N F H N Y F G G S E I V V A G K F D P A K L D Q I E S V I T
 424 N H H K Q Y Y E G S E I V V A G R I A D N K Q S S F K A D V Q
 547 A T S A N T Q L V L E T - L A Q M D D L Q D F L S K D K H A D
 455 A - H G E G Q E F S I T C L V D E E E M K K L L R E R G H M L
 577 P D F T R K L W A Y L T I N Q L L A E R S L A P T A A A K R R
 485 E N H V E R L W A Y L T I Q E L L A K R - - M K V D R E E R A

608 I T R S - I L Q M S L D H H I V T P L T S L V I E N E A G D E
 514 N L S S Q A L Q M S L D Y G F V T P L T S M S I R G M A - D Q
 638 R M L A D A P Q D - P S C C S G A L Y Y G S K V V P D S T P
 544 D G L - - K P T I D K P S E D S P P L - E M L G P R R T F V L
 668 S W A N P S P T P V I S M L A Q G S Q V L E S T P P P H V M R
 572 S A L Q P S P T H S S S - - - - N T Q R L - - - - P D R V T G
 699 V E N D P H F I I Y L P K S Q K N I C F N I D S E P G K I L N
 595 V D T D P H F I I H V P Q K E D T L C F N I N E E P G V I L S
 730 L V S D P E S G I V V N G Q L V G A K K P N N G - K L S T Y F
 626 L V Q D P N T G F S V N G Q L I G N K A R S P G Q H D G T Y F
 760 G K L G F Y F Q S E D I K I E I S T E T I T L S H G S S T F S
 657 G R L G I A N P A T D F Q L E V T P Q N I T L N P G F G G P V
 791 L S W S D T A Q V T N Q - - R V Q I S V K K E K V V T I T L D
 688 F S W R D Q A - V L R Q D G V V T I N K K R N L V - V S V D
 820 K E M S F S V L L H R V W K K H P V N V D F L G I Y I P P T N
 717 D G G T F E V V L H R V W K G S S V H Q D F L G F Y V L D S H
 851 K F S P K A H G L I G Q F M Q E P K I H I F N E R P G K D P E
 748 R M S A R T H G L L G Q F F H P I G F E V S D I H P G S D P T
 882 K P E A S M E V K G Q K L I I T R G L Q K D Y R T D L V F G T
 779 K P D A T M V V R N R R L T V T R G L Q K D Y S K D P W H G A
 913 D V T C W F V H N S G K G F I D G H Y K D Y F V P Q L Y S F L
 810 E V S C W F I H N N G A G L I D G A Y T D Y I V P D I F
 944 K R P

Abb.23: Anordnung der Primärstrukturen von Protein-2 (obere Zeile) und Protein-3 (untere Zeile) um maximale Sequenzübereinstimmung zu erhalten. Identische Aminosäuren sind umrahmt.

VI-4 Mögliche physiologische Bedeutung der Komplex-Natur des Inter- α -trypsininhibitors

Der HITI-Komplex ist in vitro ein potenter Trypsininhibitor, was durch die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Inhibitor-Protease-Komplexes von $2.1 \cdot 10^{-11}$ mol belegt ist (Aubry & Bieth 1976). Neben der Inhibition der Protease kann auch die Proteolyse des Inhibitors durch dieselbe Protease als Konkurrenzreaktion ablaufen. Gemeint ist hierbei nicht die proteolytische Spaltung der

reaktiven Peptidbindung P_1-P_1' des Inhibitors, sondern die Spaltung an anderen Stellen im HITI-Komplex die nicht an der Komplexbildung von Inhibitor und Protease beteiligt sind (vermutlich an Protein-2 und -3). Diese Aussage gilt für sämtliche Proteasen, die von HITI gehemmt werden (Pratt & Pizzo, 1987). Die Spaltungen des HITI-Komplexes sind jedoch weder Voraussetzung für die Inhibition der Protease, noch verhindern sie diese oder bedingen sie eine Änderung des Inhibitionsspektrums. Vielmehr zeigen die entstehenden HITI-Fragmente, soweit sie Kunitztyp-Domänen enthalten, gleiches Inhibitionsverhalten. Auch sind die Halbwertszeiten der Inhibition für Plasmin oder Leukozytenelastase um Größenordnungen größer als die von α_2 -Proteinaseinhibitor bzw. α_1 -Proteinaseinhibitor, den spezifischen Inhibitoren dieser Enzyme (Pratt & Pizzo, 1987). Nach der Injektion von ^{125}I -markiertem HITI-Trypsin-Komplex in Mäuse wird die Protease sehr rasch auf α_2 -Makroglobulin oder α_1 -Proteinaseinhibitor übertragen (Pratt & Pizzo, 1985). Ob HITI lokal, etwa nach Bindung bzw. Anreicherung an endothelialen Membranen die Funktion eines Proteinaseinhibitors in vivo hat oder erlangt, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Der aktuelle Kenntnisstand läßt ein Zielenzym für den HITI-Komplex nicht zuverlässig definieren.

Bezüglich der Funktion des HITI-Komplexes sind auch die Experimente von McKeehan et al., (1986) von Bedeutung. Die Gruppe konnte zeigen, daß HUTI in vitro das Wachstum von Endothelzellen stimuliert. Ob der HITI-Komplex auf diese Zellen in vitro eine ähnliche Wirkung hat ist bislang nicht getestet worden. Aufgrund seiner hohen Konzentration im Plasma (500mg/l) ist eher anzunehmen, daß der HITI-Komplex diese Eigenschaft nicht besitzt. Vermutlich ist die Funktion von HITI-Protein-2 und -3 der Transport der Kunitztyp-Domänen im Plasma. Ob der Transport zu bestimmten Zellen erfolgt oder ob der HITI-Komplex einer Speicherform der Kunitztyp-Domänen im Plasma entspricht, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht klar. Man könnte sich jedoch vorstellen, daß zum Beispiel bei Beschädigung von Gefäßwänden und der damit verbundenen Aktivierung einer beträchtlichen Anzahl von Proteasen der Inhibitoran-

teil aus HITI proteolytisch freigesetzt wird und dann direkt am Ort der Verletzung die Neubildung von Endothelzellen stimuliert.

Durch das Klonieren der cDNA-Moleküle aller drei HITI-Proteine sowie der Aufklärung der Primärstruktur des HITI-Komplexes werden erstmals weitergehende systematische Untersuchungen der Struktur des Komplexes und seiner Funktion in der Zirkulation ermöglicht.

VII. Literatur

- Aubry, M. and Bieth, J. (1976) A kinetic study of the inhibition of human and bovine trypsins and chymotrypsins by the inter- α -trypsin inhibitor from human plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 438, 221-230.
- Benton, W.D. and Davis, R.W. (1977) Screening lambda gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196, 180-182.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bourguignon, J., Vercaigne, D., Sesboué, R., Martin, J.-P. and Salier, J.-P. (1983) Inter-alpha-trypsin inhibitor (ITI): Two distinct mRNAs in baboon liver argue for a discrete synthesis of ITI and ITI derivatives. *FEBS Lett.* 162, 379-383.
- Chawla, R.K., Wadsworth, A.D. and Rudman, D. (1978) Relation of the urinary cancer-related glycoprotein EDC1 to plasma inter- α -trypsin inhibitor. *J. Immunol.* 121, 1636-1639.
- Chen, E.J., and Seeburg, P.H. (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4, 165-170.
- Clarke, L. and Carbon, J. (1976) A colony bank containing synthetic ColEI hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. *Cell* 9, 91-99.
- Dietl, T., Dobrinski, W. and Hochstraßer, K. (1979) Human inter- α -trypsin inhibitor. Limited proteolysis by trypsin, plasmin, kallikrein and granulocytic elastase and inhibitory properties of the cleavage products. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1313-1318.
- Fritz, H., Heimbürger, N., Meier, M., Arnold, M., Zaneveld, L.J.D. and Schumacher, G.F.B. (1972) Humanakrosin: Zur Kinetik der Hemmung durch Human-Seruminhibitoren. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1953-1956.
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. and Robson, B. (1978) Analysis of the Accuracy and Implications of Simple Methods for Predicting the Secondary Structure of Globular Proteins. *J. Mol. Biol.* 120, 97-120.
- Gebhard, W., Schreitmüller, T., Hochstraßer, K. and Wachter, E. (1988) Complementary DNA and derived amino acid sequence of the inter- α -trypsin inhibitor complex. *FEBS Lett.* 229, 63-67.
- Gebhard, W., Leysath, G and Schreitmüller, T. (1988) Inter- α -Trypsin Inhibitor is a Complex of Three Different Protein Species. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 19-22.

Graham, A., Steven, J., McKechnie, D. and Harris, W.J. (1986) Sequencing of Plasmid DNA with AMV reverse Transcriptase BRL Focus 8, No 2.

Grunstein, M. and Hogness, D. (1975) Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 3961.

Heide, K., Heimbürger, N. and Haup, H. (1965) An inter-alpha-trypsin inhibitor from human serum. Clin. Chim. Acta 11, 1953-1956.

Heimbürger, N., Haupt, H. and Schwick, H.G. (1971) Proteinase inhibitors of human plasma. In: Fritz, H. and Tschesche, H. (Eds.), Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors 1970, Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 1-22.

Heinrich, P. (1985) Leitfaden zum schnellen und einfachen Plasmid-Sequenzieren. Institut für Biochemie der Universität München, Arbeitskreis Prof. Hartmann.

Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene 28, 351-359.

Hochstraßer, K., Feuth, H., Fall, I., Kemkes, B. (1974) Säure-stabile Proteinaseinhibitoren im Blutplasma bei verschiedenen Nephropathien. Klin. Wschr. 52, 1015.

Hochstraßer, K., Bretzel, G., Feuth, H., Hilla, W. and Lempart, K. (1976) The inter- α -trypsin inhibitor as precursor of the acid-stable proteinase inhibitors in human serum and urine. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 153-162.

Hopp, T.P. and Woods, K.R. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 3824-3828.

Ivanov, I. and Gigova, L. (1985) Isolation of Lambda-Phage DNA by Hydroxylapatite Chromatography. Analytical Biochemistry 146, 389-392.

Jessen, T.E., Faarvang, K.L. and Ploug, M. (1988) Carbohydrate as a covalent crosslink in human inter- α -trypsin inhibitor: a novel plasma protein structure. FEBS Lett. 230, 195-200.

Jochum, M. and Bittner, A. (1983) Inter- α -trypsin inhibitor of human serum: an inhibitor of polymorphonuclear granulocyte elastase. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1709-1715.

Kaumeyer, J.F., Polazzi, J.O. and Kotick, M.P. (1986) The mRNA for a proteinase inhibitor related to the HI-30 domain of inter- α -trypsin inhibitor also encodes α_1 -microglobulin (protein HC). Nucleic Acids Res. 14, 7839-7849.

Kwok, S.C.M., Ledley, F.D., DiLella, A.G., Robson, K.J.H. and Woo, S.L.C. (1985) Nucleotide Sequence of a Full-Length Complementary DNA Clone and Amino Acid Sequence of Human Phenylalanine Hydroxylase. *Biochemistry* 24, 556-561.

Kyhse-Andersen J. (1984) Elektrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 224, 680-685.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

McKeehan, W.L., Sakagami, Y., Hoshi, H. and McKeehan, K.A. (1986) Two Apparent Human Endothelial Cell Growth Factors from Human Hepatoma Cells Are Tumor-associated Proteinase Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 261, 5378-5383.

Morii, M. and Travis, J. (1985) The reactive site of human inter- α -trypsin inhibitor is the amino-terminal half of the protein. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366, 19-21.

Péjaudier, L., Kichenin, V., Audran, R. and Steinbuch, M. (1983) Some proteins not belonging to the clotting or to the kallikrein-kinin system altered by kallikrein. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364, 651-654.

Pratt, C.W. and Pizzo, S.V. (1986) In Vivo Metabolism of Inter- α -Trypsin Inhibitor and Its Proteinase Complexes: Evidence for Proteinase Transfer to α_2 -Macroglobulin and α_1 -Proteinase Inhibitor. *Arch. Biochim. Biophys.* 248, 587-596.

Pratt, C.W. and Pizzo, S.V. (1987) Mechanism of Action of Inter- α -Trypsin Inhibitor. *Biochemistry* 26, 2855-2863.

Queen, C. and Korn, L.J. (1984) A comprehensive sequence analysis program for the IBM personal computer. *Nucleic Acids Res.* 12, 581-599.

Rauth, G. (1987) Molekulare Klonierung von C1-Inhibitor des Menschlichen Komplementsystems, Universität München.

Sanchez-Pescador, R. and Urdea, M. (1984) Use of Unpurified Synthetic Deoxynucleotide Primers for Rapid Dideoxynucleotide Chain Termination Sequencing. *DNA* 3, 339-343.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.

Schreitmüller, T., Hochstraßer, K., Reisinger, P.M.W., Wachter, E. and Gebhard, W. (1987) cDNA Cloning of Human Inter- α -Trypsin Inhibitor Discloses Three Different Proteins. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368, 963-970.

Shulman, N.R. (1955) A proteolytic inhibitor with anticoagulant activity separated from human urine and plasma. *J. Biol. Chem.* 213, 655-671.

Silhavy, T.J., Berman, M.L. and Enquist, L.W. (1984) Experiments With Gene Fusions, pp. 89-90, 93-94, Cold Spring Harbor, New York.

Steinbuch, M. and Loeb, J. (1961) Isolation of an α_2 -globulin from human plasma. *Nature* 192, 1196.

Steinbuch, M., Audran R., Reuge, C. et Blatrix, C. (1966) Etude d'une α -globuline contenant du zinc: la protéine π . *Protides Biol. Fluids*, 14, 185-188.

Steinbuch, M. (1976) The Inter- α -trypsininhibitor. In: Lorand, L. (Ed.) *Methods in Enzymologie* 45, pp. 760-772, Academic Press, New York, San Francisco, London.

Thiele, U., Auerswald, E.A., Gebhard, W., Assfalg-Machleidt, I., Popovic, T. and Machleidt, W. (1988) Gene Synthesis, Expression and Isolation of an Inhibitorily Active MS-2 pol-Stefin B Fusion Protein and Preparation of Des[Met^{1,2}]stefin B. In: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 369, pp. 1167-1178.

Vogel, R. (1984) Immunologische Aspekte des Inter- α -trypsin-Inhibitors aus menschlichem Plasma. Diplomarbeit an der Fakultät Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14, 4683-4690.

Wachter, E. and Hochstraßer, K. (1979) Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor. III. Sequence of the two Kunitz-type domains inside the native inter- α -trypsin inhibitor, its biological aspects and also of its cleavage products. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1305-1311.

Wachter, E. and Hochstraßer, K. (1981) Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor. IV. The amino acid sequence of the urinary trypsininhibitor isolated by affinity chromatography. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362, 1351-1355.

Wallace, B.R., Johnson, M.J., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H. and Itakura, K. (1981) The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II. Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit β -globin DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 879-894.

Witte, I., Jochum, M., Scherer, R., Schramm, W., Hochstraßer, K. and Fritz, H. (1982) Disturbances of Selected Plasma Proteins in Hyperdynamic Septic Shock. *Intensive Care Medicine* 8, 215-222.

Young, R.A., Bloom, B.R., Grosskinsky, C.M. Ivanyi, J., Thomas, D. and Davis, R.W. (1985) Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 2583-2587.

Zagursky, R.J., Baumeister, K., Lomax, N. and Berman, M.L. (1985) Rapid and Easy Sequencing of Large Double-Stranded DNA and Supercoiled Plasmid DNA. *Gene Anal. Techn.* 2, 89-94.

VIII. Abkürzungsverzeichnis

Bp	-	Basenpaare
EDTA	-	Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
HITI	-	Humaner Inter- α -trypsininhibitor
HUTI	-	Humaner Harntrypsininhibitor
IPTG	-	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
pfu	-	Plaque forming units
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
Tris	-	Tri-(hydroxymethyl) aminomethan
X-Gal	-	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

IX. Lebenslauf

- 02.09.1956 geboren in Speyer als erstes Kind von Friedrich und Ruth Schreitmüller, geb. Weyerich.
- 1962-1965 Besuch der Grundschule in Schifferstadt.
- 1966-1979 Besuch der Hauptschule Göggingen (Qualifizierender Abschluß, der Realschule Völkstraße (Mittlere Reife) und des Holbein-Gymnasiums in Augsburg.
- 27.06.1979 Reifeprüfung
- 01.11.1979 Beginn des Studiums der Chemie
- 13.05.1982 Diplom-Vorprüfung
- 26.07.1984 Diplom-Hauptprüfung
- 01.10.1984-
- 01.06.1985 Erstellung der Diplomarbeit
 "Die Primärstruktur des Hämoglobins des Eisbären"
 am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
 bei Prof. Braunitzer
- 01.07.1985-
- 01.07.1988 Erstellung dieser Dissertation

